

Série A, n°

N° d'ordre :

118

Paris 1971

THESE

PRESENTÉE

AU CENTRE D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE

PAR

SCHENBERG ép. FRASCINO Ana Clara

"Effets létaux et mutagènes d'une température supra-optimale
sur la levure. Réparation de ces effets."

Soutenue le 27.10.1971 devant la Commission d'examen

M.M.P. SCHAEFFER

Président.

R. LATARJET

P. VIGIER

R. DEVORET

} Examineurs.

THESE

PRESENTEE

AU CENTRE D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE

PAR

SCHENBERG ép. FRASCINO Ana Clara

"Effets létaux et mutagènes d'une température supra-optimale
sur la levure. Réparation de ces effets."

Soutenue le 27.10.1971 devant la Commission d'examen

M.M.P. SCHAEFFER

Président.

R. LATARJET

P. VIGIER

R. DEVORET

Examineurs.



Ce travail a été effectué au laboratoire de Radiobiologie Fondamentale de l'Institut du Radium - Biologie d'Orsay.

Je tiens à remercier le Dr. L. PEREIRA DA SILVA, Maître de Recherches au CNRS, qui m'a aidée à venir en France et m'a introduite auprès du Dr. E. MOUSTACCHI.

Je suis heureuse d'exprimer toute ma reconnaissance au Dr. R. LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium - Biologie, qui a eu la grande gentillesse d'accepter de m'accueillir dans son Institut en tant que boursière étrangère. Il a grandement participé à ma formation scientifique et me fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je désire remercier ici le Dr. P. SCHAEFFER, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay, qui a bien voulu assumer la présidence de mon jury de thèse.

Le Dr. P. VIGIER, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay, a bien voulu accepter la charge d'être le rapporteur de cette thèse. L'attention amicale qu'il a apportée à ce travail, les critiques qu'il a faites m'ont beaucoup aidée à lui donner sa forme définitive. Je lui en exprime

toute ma gratitude.

Je tiens à remercier le Dr. R. DEVORET, Maître de Recherches au CNRS, pour avoir participé d'une manière fondamentale à ma formation scientifique et pour l'honneur qu'il me fait d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr. E. MOUSTACCHI, Maître de Recherches au CNRS, qui a bien voulu me donner l'hospitalité de son laboratoire pendant plus de trois ans et qui a suggéré et dirigé mon travail de recherche. A son enseignement et à sa grande culture scientifique, je dois ma formation dans la recherche. Ses conseils et ses encouragements constants ont permis l'aboutissement de cette thèse. Qu'elle reçoive ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Je désire remercier ici mon collègue R. CHANET, avec qui j'ai fait la mise au point de la technique de séparation des cellules pour l'obtention de cultures synchronisées.

Je ne puis nommer encore tous mes camarades de laboratoire. Tous m'ont pourtant accompagnée de leur amitié et de leur compréhension ; je leur en suis reconnaissante.

Il m'est agréable de remercier Mlles S. ENTERIC et N. MARTIN et Mme Z. HRISOHO, pour la collaboration technique si précieuse, qu'avec tant de bonne volonté, parmi leurs nombreuses occupations, elles ont toujours pu m'offrir.

Il n'est que juste de souligner le dévouement de Mme Y. ROGARD qui a assuré la bonne marche de la laverie. Qu'elle veuille bien accepter mes remerciements.

Je suis heureuse de remercier Mlle F. FREY, qui a réussi, avec tant de bonne grâce, à trouver le temps de dactylographier les diverses versions de cette thèse et permis qu'elle soit imprimée à temps.

Je suis heureuse de remercier mon mari pour avoir supporté avec patience tant de négligences de ma part et qui m'a beaucoup aidée à terminer ce travail.

Ce travail a pu être réalisé grâce à une bourse de Coopération Technique du Gouvernement Français (1968-1970) et à une deuxième bourse Brésilienne de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (1970-1971). Ce travail a bénéficié de subventions de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

INTRODUCTION

On sait depuis longtemps que les radiations ionisantes et les radiations ultraviolettes altèrent le matériel génétique des cellules, entraînant rupture de chromosomes, mutations et suppression de la division. Les travaux des vingt dernières années ont montré qu'une fraction plus ou moins importante de ces radiolésions du génome sont restaurables.

Cette restauration est génétiquement contrôlée et constitue un phénomène général, qui s'étend des mycoplasmes aux cellules humaines. Les mécanismes de réparation des radiolésions qui ont été mis en évidence sont des processus enzymatiques complexes et perfectionnés. Or les radiations, et en particulier les radiations ionisantes, ne sont pas présentes dans l'environnement actuel à des doses suffisamment importantes pour qu'elles puissent représenter une menace réelle pour la survie et la stabilité génétique des organismes.

On pense donc que, s'ils ont été préservés et raffinés au cours de l'évolution des espèces, de tels mécanismes de réparation pourraient avoir d'autres fonctions essentielles au niveau cellulaire.

Les travaux de ces dernières années indiquent que les enzymes de "réparation" (ADN polymérase, ligase, nucléases) jouent probablement un rôle important dans la réplication de l'ADN, dans les processus de recombinaison génétique et de mutagénèse. Il est également probable qu'elles interviennent dans la réparation des lésions causées par des agents chimiques et physiques autres que les radiations. On a vu effectivement que des lésions produites par des agents aussi divers que les rayons X, la nitrosoguanidine, la mitomycine C et l'agent alkylant méthylméthane sulfonate (MMS) peuvent être réparées dans des souches d'*Escherichia coli* radiorésistantes (103). Si on compare les courbes de survie de différentes souches de bactéries traitées à l'ypérite azotée à des courbes de survie aux rayons ultraviolets, on trouve un parallélisme entre l'effet des deux agents (35).

Brendell et coll. (7) ont montré récemment que, chez *Saccharomyces cerevisiae*, un même locus contrôle la réparation des lésions de l'ADN provoquées par les rayons UV, les rayons X, le MMS et l'ypérite azotée.

Ceci suggère que ce sont les distortions du squelette de la molécule d'ADN provoquées par les altérations des bases ou par les ruptures de chaîne qui sont "reconnues" d'une manière générale par les enzymes de réparation. Autrement dit, on peut penser qu'une grande variété de défauts structuraux chimiquement différents de l'ADN seraient réparés par un ou plusieurs mécanismes communs.

Un certain nombre de preuves biochimiques ont été accumulées qui sont en faveur de cette idée.

Ainsi Hanawalt et coll. ont démontré qu'il existe une synthèse de réparation de l'ADN chez *Escherichia coli* après traitement à l'ypérite azotée (33), après carence en thymine (72), de même qu'ils l'avaient déjà démontré pour la réparation des lésions UV (74). Reiter et Strauss ont trouvé ce type de synthèse de réparation de l'ADN à la suite du traitement de *Bacillus subtilis* par le MMS (82). Par ailleurs, il a été démontré que le MMS produit comme les rayons X des cassures au niveau des simples brins d'ADN (110,52). Ces cassures sont réparables dans les deux cas par les mêmes enzymes (36).

Il a été suggéré que les mécanismes enzymatiques, dont dépend la réparation des radiolésions et des lésions produites par ces différents agents chimiques, réparent également des lésions produites par l'augmentation de la température (8).

La température constitue l'un des facteurs importants du biotope. Des fluctuations notables de ce facteur se sont sans doute produites au cours de l'évolution géophysique du globe terrestre. Il n'est donc pas impossible d'envisager que des mécanismes de restauration des altérations cellulaires produites par des élévations de température aient été sélectionnés au cours de l'évolution des espèces vivantes, mécanismes qui, répétons-le, pourraient être communs à d'autres agressions subies par le génome.

Chez *Escherichia coli*, Bridges et coll. (8) ont observé une corrélation entre la sensibilité aux radiations ionisantes et la sensibilité à une température supra-optimale. C'est-à-dire que les mutants radio-sensibles se montrent également thermosensibles par rapport au type sauvage.

Nous nous sommes demandé si ces observations pouvaient être appliquées à des organismes eucaryotes plus complexes que les bactéries. Nous avons choisi la levure pour effectuer cette étude. Cet organisme a

déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux sur les effets thermiques (96,123), son cycle cellulaire est bien défini (126) et enfin de nombreux mutants radiosensibles génétiquement caractérisés sont à notre disposition. La levure offre de plus la possibilité d'analyser à côté des effets létaux, les effets mutagènes nucléaires et cytoplasmiques.

Nous avons conçu cette étude de deux points de vue :

- étude de l'action d'une température supra-optimale
- étude comparative des effets de la température supra-optimale et des effets des radiations.

L'étude de l'action thermique en soi présente un grand intérêt, puisqu'aujourd'hui encore le mécanisme par lequel l'élévation de la température lèse les cellules vivantes n'est pas élucidé. La plus grande partie des recherches sur l'inactivation thermique, qui remontent au siècle dernier, étaient motivées par les problèmes de stérilisation des aliments.

Ayant pour but cet aspect pratique, on a négligé une approche quantitative qui aiderait à comprendre les mécanismes mis en oeuvre. En général les études sur les températures supra-optimales ne se préoccupaient que de réduire le nombre d'organismes viables au moindre niveau et on a porté peu d'attention à la partie survivante de la population.

On discute encore aujourd'hui sur la nature de la cible fondamentalement impliquée dans l'inactivation par l'élévation de la température. Les candidats les plus cités sont les protéines, l'ADN, plus récemment les ARN (88-12) et les lipoprotéines (55) ; on parle rarement des effets de la température sur les membranes (37).

Il y a plusieurs faits qui incitent à penser que l'une des cibles principales de l'effet thermique est l'appareil génétique. Toutefois, aucun de ces arguments n'est pour l'instant irréfutable et n'élimine pas d'une façon définitive l'implication de protéines.

1 - Effet de la ploïdie sur la thermosensibilité.

Si on considère que l'appareil génétique est en cause dans l'effet léthal de l'élévation de température, les cellules diploïdes devraient être plus thermorésistantes que les haploïdes : pour que la perte de l'activité d'un locus donné ait lieu chez le diploïde, les 2 sites correspondants devraient être inactivés.

C'est, en effet, ce que Wood a trouvé : les cellules diploïdes sont environ 2,5 fois moins sensibles à l'effet létal de la température de 52°C que les haploïdes (124).

2 - Effet mutagène de la température.

Zamenhof et Greer ont découvert chez *Escherichia coli* l'induction de plusieurs classes de mutants par l'incubation prolongée à 60°C (129). En continuant cette étude, Zamenhof a obtenu une fréquence élevée de mutations (1-10 % d'auxotrophes) par le chauffage de spores de *Bacillus subtilis* ou de cellules végétatives d'*Escherichia coli* à l'état sec dans le vide à 135°C pendant 16 minutes. Par des expériences de transformation de *Bacillus subtilis*, il a montré que les mutants ainsi obtenus sont bien de nature chromosomique et non cytoplasmique (128). Les températures supra-optimales pourraient agir initialement non pas sur la molécule d'ADN elle-même mais sur les enzymes qui assurent la fidélité de la reproduction du code génétique. Ceci aurait pour conséquence l'apparition de mutations.

3 - Action de la température sur la recombinaison génétique.

Une élévation de la fréquence des recombinaisons par des variations de température a été décrite pour différents organismes. Dès 1917, Plough démontrait l'existence chez la *Drosophile* d'une corrélation négative entre la fréquence des recombinaisons et des températures au-dessous de 25°C ; cette corrélation devient positive à des températures supérieures (75).

Chez le bactériophage λ , Radman a trouvé une augmentation de la fréquence des recombinaisons en exposant le complexe bactérie-phage à 45°C (communication personnelle).

Chez la levure, pour un chromosome portant différents marqueurs génétiques, il a été montré que, si la sporulation a lieu à 15°C, la fréquence des échanges (crossing-over) n'est pas affectée pour la majorité des segments chromosomiques. Cependant, certaines régions spécifiques du chromosome montrent une réduction nette de la fréquence des recombinaisons méiotiques dans ces conditions (40). L'effet d'une élévation de la température sur la recombinaison n'a pas à notre connaissance été étudié

jusqu'ici sur cet organisme.

Les résultats sont très variables entre différents organismes et, au sein d'un même organisme, il y a des régions sensibles, d'autres insensibles à l'effet de température. La composition en bases de certains segments de l'ADN pourrait être responsable de ces différences selon les régions chromosomiques concernées : on sait que les liaisons A-T sont énergétiquement moins stables que les liaisons G-C. Une autre possibilité est que les variations de température agissent au niveau des enzymes nécessaires au processus de recombinaison (108).

La température pourrait également affecter la recombinaison génétique en partie d'une manière indirecte, par l'atteinte de processus physiologiques thermosensibles. Par exemple, l'ATP constitue un facteur essentiel pour l'activité d'enzymes qui interviennent dans la recombinaison, telle l'exonucléase III ATP-dépendante (11) ; le système générateur d'ATP lié aux mitochondries pourrait être lésé par des changements de température (44).

4 - Allure exponentielle de la courbe de survie.

L'inactivation thermique (températures de l'ordre de 50°C) de divers organismes uni-cellulaires présente une allure exponentielle. La courbe exponentielle signifie qu'un seul événement est responsable de la chaîne d'événements qui conduit à la perte de la viabilité.

Dès 1945, Rahn (81) a associé cet événement unique avec "les unités de l'appareil de reproduction, c'est-à-dire les gènes".

La mort ne peut sans doute pas être due à l'inactivation partielle d'un système multiunitaire. De multiples exemplaires de chaque enzyme sont présents dans une cellule et il est légitime de penser que la cellule ne serait inactivée que lorsqu'une partie importante des molécules protéiques sont détruites. En outre, une telle cellule resynthétiserait ces enzymes si l'intégrité de son ADN était maintenue. Le cas particulier de l'inactivation possible d'enzymes essentielles pour la réplication de l'ADN présentes en nombres d'exemplaires limités ou celui d'un site unique (association nucléo-protéine-membrane) sera envisagé dans la discussion finale de ce travail.

5 - Effet de la température sur la division.

Il a été constaté il y a fort longtemps que les températures supra-optimales inhibent la croissance (85). Le temps de génération de *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, est 2,5 fois plus long à 39°C qu'à 33°C. Des méthodes de synchronisation par choc thermique ont été décrites. La division cellulaire semble être plus touchée que la croissance car il y a une augmentation de la masse cellulaire en absence de division (50).

Les cellules, après le traitement thermique, présentent une phase de latence plus prolongée lorsqu'elles sont incubées en milieu frais à la température optimale de croissance (38-41-116). A part ce retard initial, la croissance est normale. Cette phase de latence exagérée correspond sans doute à une période de réparation des effets thermiques (37).

Chez les Euplotes, protozoaires ciliés macronucléés, où on peut suivre aisément la synthèse d'ADN nucléaire, on a récemment montré que le choc thermique à des températures sub-létales provoque l'interruption complète de la synthèse d'ADN (21).

6 - Action des hautes températures sur le facteur transformant.

Dès 1944, Avery et coll. (1) constatèrent que le pouvoir transformant du Pneumocoque est thermo-sensible.

Zamenhof et coll., ont montré par la suite que l'ADN d'*Haemophilus influenzae* perd son pouvoir transformant par action du chauffage à 76°C et que différents marqueurs génétiques ne présentent pas la même thermosensibilité (130-131). De même, Marmur et Doty (54) décrivent l'inactivation thermique différentielle des marqueurs de l'ADN transformant de *Diplococcus pneumoniae* ; cette inactivation différentielle a été corrélée avec la teneur en G-C car ces auteurs démontrent une corrélation entre la température critique et la teneur en G-C de différents ADN.

Ginoza et Zimm (26) et Roger et Hotchkiss (86) ont ensuite démontré qu'il y a deux différents processus d'inactivation thermique du pouvoir transformant : il y a une inactivation "critique", liée à un "collapsus" physique de molécules entières à la suite de la rupture des

liaisons hydrogènes (dénaturation) et une inactivation "sous-critique", qui engage la lésion de régions limitées d'une molécule d'ADN, probablement par une dépurination.

7 - Mise en évidence de ruptures de l'ADN de bactéries chauffées.

Bridges et coll. (9) ont montré que l'incubation d'*Escherichia coli* à 52°C entraîne des ruptures de simple chaîne sur l'ADN, phénomène bien connu de l'action des radiations ionisantes et des agents alkylants.

Aucune de ces observations n'est une preuve définitive quant à la nature du mécanisme moléculaire des effets du chauffage. En particulier, il n'est pas prouvé que le site primaire atteint par l'élévation de la température soit l'ADN lui-même. Les altérations de l'ADN observées pourraient être la conséquence de modifications se situant initialement à d'autres niveaux. Ces données apportent cependant un faisceau d'arguments pour inciter à penser que le matériel génétique est très probablement atteint.

Notre travail se divise en 4 chapitres :

- 1) L'effet létal d'une température supra-optimale au cours du cycle cellulaire
- 2) L'effet mutagène d'une température supra-optimale au cours du cycle cellulaire
- 3) La réparation des effets thermiques létaux et mutagènes
- 4) Comparaison entre la thermosensibilité et la radiosensibilité.

Nous avons commencé par étudier l'effet létal d'une température supra-optimale sur une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ayant trouvé une courbe de survie à deux composantes, nous avons été conduits à étudier la fraction thermorésistante de la population.

Au cours de ce travail, une très grande variabilité de la sensibilité à l'effet létal d'une même souche a été observée. Nous avons trouvé que cette variabilité est en grande partie due à la phase de croissance pendant laquelle les cellules sont soumises au traitement thermique.

Ceci nous a conduits à étudier l'effet thermique létal sur des populations en croissance synchronisée.

En étudiant l'effet mutagène cytoplasmique du chauffage, le manque de reproductibilité d'une expérience à l'autre, nous a également frappés. Il s'est donc avéré utile d'examiner aussi l'induction de ce type de mutations dans des populations synchronisées.

Nous avons ainsi pu définir les fluctuations de la thermosensibilité aux effets létaux et mutagènes cytoplasmiques en fonction du cycle cellulaire.

En ce qui concerne l'induction thermique de mutants nucléaires, il n'a été possible, pour des raisons d'ordre pratique, que d'examiner l'influence de la phase de croissance de cultures non synchrones sur la sensibilité à cet effet. En effet, la méthode de synchronisation adoptée ne permet pas d'avoir le nombre de cellules nécessaire pour la recherche de ces mutants.

Par ailleurs, une étude a été faite de la réparation trouvée pour l'effet létal et mutagène de la température surpa-optimale, de façon à savoir si cette réparation est soumise ou non à un contrôle métabolique. Pour ce faire, la thermo-dépendance de la réparation a été examinée ainsi que l'influence de la synthèse protéique nucléaire sur la réparation.

Finalement, nous avons cherché s'il existe un parallélisme entre la thermosensibilité et la radiosensibilité, en comparant la réponse

de différents mutants radiosensibles à l'effet létal de la température supra-optimale.

MATERIEL ET METHODES

A - SOUCHES

Les souches haploïdes suivantes de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées :

<u>Désignation</u>	<u>Provenance</u>	<u>Caractéristiques</u>
N123	OGUR	ahi ₁
N123-UVS ₂	MOUSTACCHI	ahi ₁ rad ₁
5d N123xrad ₆ COX	MOUSTACCHI	clone monosporique (hi ₁) issu du croisement N123xrad ₆ COX (ahi ₁ x α ad ₂ rad ₆)
5c N123xrad ₆ COX	MOUSTACCHI	clone monosporique (hi ₁ rad ₆) issu du croisement N123xrad ₆ COX (ahi ₁ x α ad ₂ rad ₆)
X1687-101B	RESNICK	a ar ₄₋₁₇ hi ₅₋₂ ly ₁₋₁ ad ₂₋₁ le ₁₋₁₂
KC376	RESNICK	" " " " " " xs ₁
KC383	RESNICK	" " " " " " xs ₂₋
KC410-4d	RESNICK	" " " " " " xs ₃
KC372	RESNICK	" " " " " " rad ₁
S1437-11b	SNOW	a rs ₄
S1448-3d	SNOW	a rs ₁₃
P192	ZAKHAROV	a ad ₁
P22	ZAKHAROV	a ad ₁ xrs ₅

Nous avons adopté pour les mutants sensibles aux rayons ultraviolets, la nomenclature proposée par Game et Cox (à paraître dans *Mutation Research*).

a et α désignent le signe des souches.

Les déficiences biochimiques de ces souches sont indiquées suivant les conventions adoptées à la "Carbondale Yeast Genetics Conference MGB 1961".

hi = histidine

ar = arginine

ly = lysine

ad = adénine

le = leucine

B - MILIEUX DE CULTURE

1°) Milieu complet ou YEP

a) Solide : Yeast Extract Difco	5 g
Glucose	20 g
Bacto-Peptone	20 g
Bacto-Agar	20 g

pour 1 litre d'eau distillée

b) Liquide : Yeast Extract Difco	5 g
Glucose	20 g
Bacto-Peptone	20 g

pour 1 litre d'eau distillée

2°) Milieu minimum synthétique ou MM

a) Solide :

- a-1 - On stérilise par autoclavage à 120°C le mélange glucose 20 g, Bacto-agar 40 g pour 1 l d'eau distillée.
- a-2 - On stérilise par filtration une solution de 6,7 % de Bacto Yeast nitrogen Base sans amino-acides (BYNB W/O Amino Acids Difco). La solution est conservée à - 20°C.
- a-3 - Au moment de l'emploi, on ajoute 100 ml de la solution BYNB à 1 litre du mélange glucose-agar.

b) Liquide :

- b-1 - On stérilise par autoclavage à 120°C une solution de NaCl à 9‰.
- b-2 - On stérilise par filtration le mélange :
- | | |
|---|-------|
| Bacto Yeast Nitrogen Base sans amino acides Difco | 67 g |
| Glucose | 200 g |
- pour 1 litre d'eau distillée
- Ce mélange est conservé à - 20°C.
- b-3 - Au moment de l'emploi on dilue au 1/5è le mélange dans la solution saline.

Pour les souches auxotrophes, les facteurs de croissance requis sont additionnés au milieu minimum à la concentration finale de 40 µg/ml.

3°) Milieu de pré-sporulation de MacClary (51)

Glucose	20 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	2 g
PO ₄ H ₂ K	2 g
Yeast Extract	5 g
Bacto-Agar	20 g
pour 1 litre d'eau distillée	

4°) Milieu de sporulation de MacClary (51)

Yeast Extract	2,5 g
Glucose	1 g
Chlorure de sodium	0,77 g
Sulfate de Magnésium	0,345 g
Acétate de Potassium anhydre	9,8 g
pour 1 litre d'eau bidistillée sur MnO ₄ K.	

Ces milieux ont servi à déterminer le caractère diploïde de certaines souches utilisées. On a suivi le procédé de MacClary.

C - DETECTION DE MUTANTS "PETITE COLONIE" DEFICIENTS RESPIRATOIRES

1°) Milieu complet au glycérol

a) Solide :	Yeast Extract	5 g
	Bacto-Peptone	20 g
	Glycérol	50 ml
	Bacto-Agar	40 g

pour 1 litre d'eau distillée

b) Liquide :	Yeast Extract	5 g
	Bacto-Peptone	20 g
	Glycérol	50 ml

pour 1 litre d'eau distillée

Les mutants "petite colonie" sont incapables d'utiliser des substrats non-fermentables, tel que le glycérol. Sur ce milieu ne poussent donc que les cellules ayant une respiration normale (66).

2°) Coloration au triphényltétrazolium (67)

a) Tampon phosphate

a-1 - On prépare une solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ à 9,1 g/l (solution A). Conservation à 4°C.

a-2 - On prépare une solution de $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ à 24 g/l (solution B). Conservation à 4°C.

a-3 - 39 ml de solution A sont additionnés à 61 ml de solution B (pH 7).

b) On prépare le mélange bacto-agar 1,5 % + tampon phosphate à pH 7 0.067 M.

Ce mélange est chauffé à 110°C pendant 15 minutes et conservé à la température ambiante.

c) On prépare au moment de l'emploi, une solution à 1 % de 2,3,5-triphényltetrazolium (TTC). La solution n'est pas stérilisée.

d) Au moment de l'emploi, on ajoute au milieu phosphate fondu 0,1 de la solution de TTC.

Environ 15 ml du mélange sont versés sur la boîte de Pétri contenant les colonies de levures.

Les colonies des mutants "petites" ne se colorent pas et restent blanches, tandis que les colonies normales deviennent rouges.

D - CONDITIONS DE CROISSANCE

Les souches sont conservées en tube vissé, contenant le milieu gélosé incliné YEP à 4°C.

1) Milieu liquide : La croissance s'effectue à 28°C ; une aération régulière est assurée en plaçant les cultures sur un agitateur horizontal rotatif.

2) Milieu solide : Les levures traitées sont étalées sur le milieu gélosé après dilution convenable dans la solution saline à 9‰. Les colonies (50 à 600 par boîte de Pétri) sont dénombrées au bout de 4 à 5 jours de séjour à l'étuve à 28°C.

E - DISSOCIATION DES AMAS PAR LES ULTRA-SONS

Avant d'être traitées, les cultures ayant des amas de cellules sont soumises pendant au maximum 2 minutes aux ultra-sons émis par un appareil Mullard MSE (15). En utilisant une mèche de 2 cm de diamètre (probe

n° 21918) et un volume de 10 ml sous une épaisseur de 1 cm, les amas ne dissocient sans effet létal appréciable. On a vérifié que le fait de soumettre une population de levures aux ultra-sons ne modifie en rien sa réponse.

F - SOURCES ET CONDITIONS D'IRRADIATION

1°) Rayons ultraviolets

La source est une lampe "germicide" à vapeur de mercure à basse pression. L'émission de cette lampe est en majeure partie constituée par la radiation 2537 Å.

Les doses reçues à la surface de la suspension à irradier sont déterminées à l'aide d'un dosimètre à cellule de sélénium (Dosimètre de Latarjet (47)). Pour les irradiations, la culture est diluée au dixième en solution saline à 9°/∞ (environ 1×10^5 cell/ml). Cette suspension est irradiée sous une épaisseur de 1 mm en boîte de Pétri et régulièrement agitée au cours de l'irradiation, de manière à uniformiser la dose au sein de l'échantillon. La transmission à 2537 Å de cette couche est de l'ordre de 97,5 %.

2°) Rayons gamma

On a utilisé un irradiateur à ^{60}Co de 3000 Ci comportant une cavité centrale. Le débit de dose au sein de cette cavité était de 4300 r/min au moment où nous avons commencé nos expériences (dosimétrie au sulfate ferreux) et nous avons par la suite tenu compte de la décroissance du radioélément.

On a toujours examiné la survie de cultures arrivées en phase stationnaire de croissance.

On irradiait 1 ml d'une suspension cellulaire en solution saline à 9°/∞, à la concentration maximale de 2×10^5 cell/ml, dans un tube de verre de 1 cm de diamètre x 12 cm de hauteur.

G - TRAITEMENT THERMIQUE

Le chauffage des cultures est effectué dans un bain-marie à

agitation, dont la température est réglable à $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Les cellules, issues d'une culture en phase exponentielle ou stationnaire de croissance selon le type d'expériences, sont mises en suspension dans du YEP liquide déjà en équilibre thermique avec la température du bain-marie. Les cultures sont régulièrement agitées pendant le traitement.

Nous avons en général traité des suspensions cellulaires avec une concentration comprise entre 1×10^7 et 1×10^8 cell/ml.

Des prélèvements sont effectués en fonction du temps et, après dilutions convenables dans la saline à 9‰, les cellules sont étalées sur le milieu gélosé.

Dans toutes les expériences décrites, l'étalement sur boîte de Pétri est fait en triple exemplaire et souvent 2 dilutions sont faites pour le même point. On prend la moyenne des nombres de colonies comptés.

Les graphiques représentent le résultat d'une, parmi au moins 3 expériences, ayant donné des résultats semblables.

RESULTATS

A - EFFET LETAL D'UNE TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE SUR UNE SOUCHE HAPLOÏDE SAUVAGE

1°) Choix de la température d'inactivation

Notre but étant d'étudier les effets d'une température supérieure à la température optimale de croissance des levures, nous avons commencé par faire des essais à différentes températures, de façon à choisir celle que nous utiliserions par la suite pour toutes les expériences.

La température optimale de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est de 28°C. A partir de 60°C environ, la dénaturation des protéines commence à devenir importante. Ceci a délimité la gamme des températures à étudier.

Ainsi, nous avons examiné l'effet létal produit sur une souche sauvage haploïde par l'incubation à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 52°C.

Des parties aliquotes d'une même culture en phase de croissance exponentielle (1.5×10^7 cellules/ml) ont été incubées à ces différentes températures.

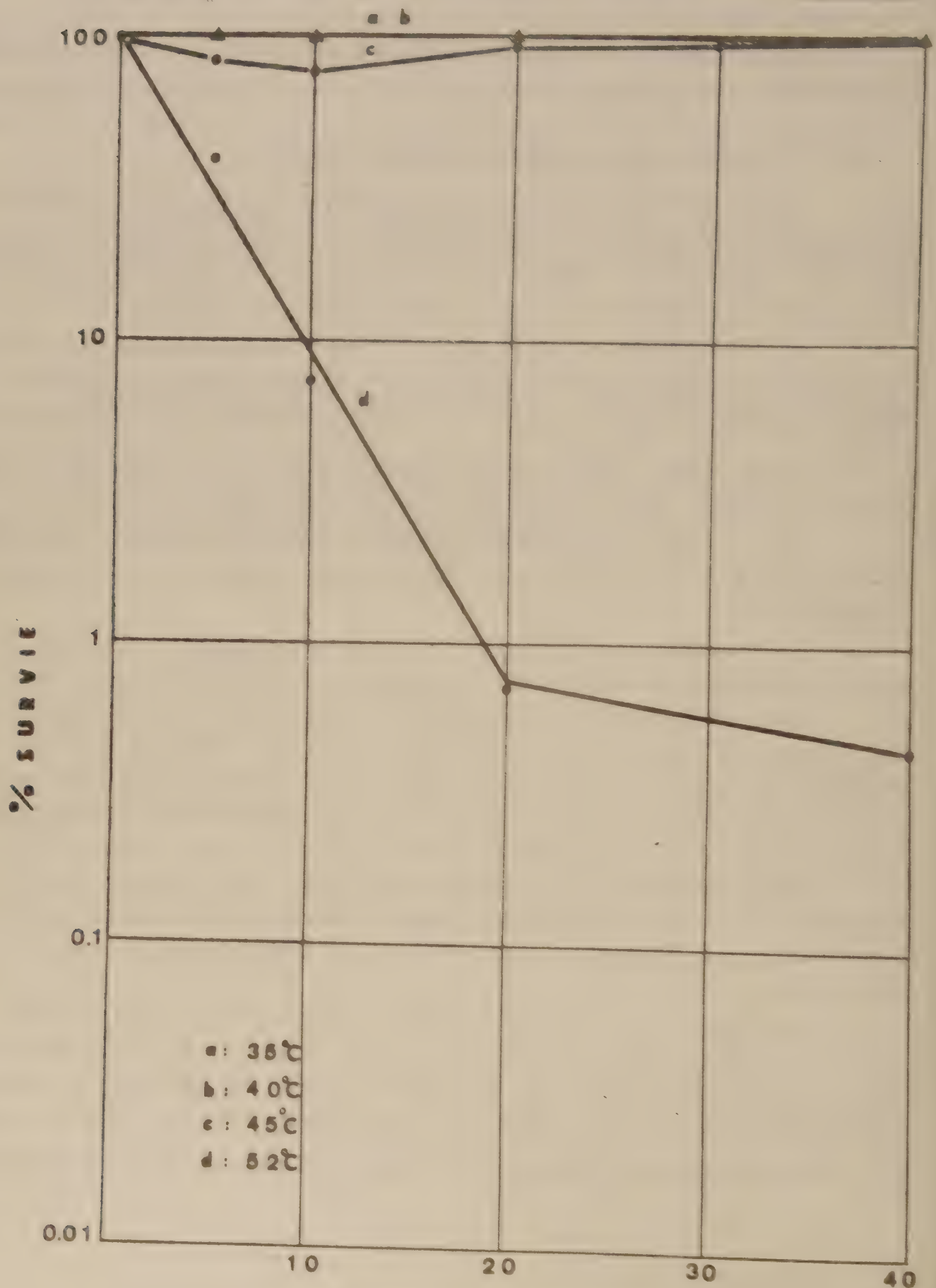
Le chauffage des cellules est fait en solution saline à 9‰, mise au préalable en équilibre thermique avec la température du bain marie.

Nous avons choisi d'effectuer l'incubation en milieu non nutritif, car jusqu'à 42°C environ les cellules se divisent (113), ce qui complique le phénomène à étudier. Par ailleurs, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différence notable pour l'effet létal des températures élevées, que l'incubation ait lieu en milieu complet ou en solution saline à 9‰.

Pour chacune de ces températures, nous avons prélevé des fractions aliquotes de la culture à divers temps d'incubation et mesuré la survie à ces temps, par étalement, après dilutions convenables, sur milieu complet solide.

La figure 1 montre que l'inactivation de l'aptitude à donner une colonie est négligeable à 30°C, 35°C, 40°C et 45°C ; elle est notable à 52°C, puisqu'après 20 minutes de séjour à cette température, on observe déjà 99 % d'inactivation. Nous avons donc décidé d'opérer par la suite à 52°C. On constate une cassure de la courbe de survie. Nous reviendrons

Fig. 1 : Survie à diverses températures supra-optimales : une souche sauvage haploïde (N 123), prélevée en phase de croissance exponentielle est incubée en solution saline à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 52°C. On détermine le nombre de survivants en fonction du temps d'incubation.



sur ce point.

Plusieurs auteurs pour étudier les effets thermiques sur des organismes pro-caryotiques (*Escherichia coli* (8-62), *Staphylococcus aureus* (37), *Salmonella thyphimurium* (112)) et eucaryotiques (*Saccharomyces cerevisiae* (123-124-96-25)) ont employé des températures de cet ordre et ne considèrent pas la dénaturation des protéines comme étant le phénomène principalement responsable de l'inactivation cellulaire.

2°) Description de l'effet létal

Conditions expérimentales : Les cellules en phase de croissance exponentielle en milieu complet liquide sont soumises aux ultra-sons pendant une minute pour dissocier les amas cellulaires.

Par l'examen au microscope (comptage à l'aide d'une cellule de Bûcker), on détermine la concentration cellulaire et le pourcentage de cellules à bourgeons.

La culture est centrifugée, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans du milieu liquide préalablement amené à 52°C.

D'une manière générale, nous avons préféré effectuer l'incubation en milieu complet car non seulement il n'y a pas de différence notable dans les résultats observés avec la solution saline, mais de plus :

- a) ceux-ci sont plus reproductibles
- b) on évite un changement brutal de milieu
- c) la comparaison de nos résultats avec ceux de Bridges et coll., (9 - 8) en particulier est facilitée car ils emploient également un milieu complet.

Un prélèvement d'une partie aliquote est effectué immédiatement afin de déterminer le nombre de cellules viables initialement présent dans la culture. Ce point correspond aux temps "zéro" d'incubation à 52°C. Nous avons constaté qu'il n'y a pas de mortalité pour un contact instantané avec le milieu à 52°C.

Des parties aliquotes sont ensuite prélevées à divers temps d'incubation à 52°C, et après dilutions convenables, sont étalées sur milieu complet. Après 5 jours à 28°C, on dénombre les colonies sur les boîtes de Pétri.

L'inactivation est donc mesurée par la perte de l'aptitude à donner une colonie de cellules chauffées en phase de croissance exponentielle

incubées pour des temps variables à la température de 52°C.

La fraction de cellules survivantes N au temps t est calculée par rapport au nombre de cellules initialement présentes, N_0 au temps t_0 .

Le logarithme de la fraction de cellules survivantes est porté en fonction du temps d'incubation à 52°C.

On constate que la courbe de survie ainsi obtenue est complexe. La première partie est une exponentielle, puis une cassure apparaît ; la pente de la deuxième partie de la courbe est nettement plus faible. Des courbes cassées du même type ont été retrouvées à 52°C pour différentes souches sauvages haploïdes (fig. 2). On note que la pente de la 1ère partie des courbes de survie varie peu, tandis que le niveau de la cassure de ces courbes varie beaucoup d'une souche sauvage haploïde à une autre, toujours traitées dans les mêmes conditions.

Sur la figure 3 on voit la courbe de survie à 52°C obtenue pour une souche sauvage diploïde traitée en croissance exponentielle (souche ND, résultant du croisement N 123 x 10018).

La courbe d'inactivation de cette souche présente également une cassure nette. Le nombre de points très réduits que nous avons effectués pour l'établissement de la 1ère partie de cette courbe ne nous permet pas de déterminer avec précision le nombre d'extrapolation à l'axe des ordonnées qui indiquerait le nombre de coups nécessaires à l'inactivation. D'après les données de la littérature, les courbes de survie à l'effet thermique des levures diploïdes sont généralement des sigmoïdes.

Dans un travail qui remonte à 1939 (4) une cassure au niveau de 0.01 % de survivants des courbes de survie de levure à la température de 55°C avait été signalée sans que toutefois les causes de cette hétérogénéité ne soient claires. Par la suite, les différents auteurs et Wood en particulier (123-124) qui ont étudié l'inactivation thermique des levures n'ont plus prêté attention à cette particularité. Wood ne l'observait d'ailleurs pas dans ses conditions expérimentales.

Je me suis attachée à comprendre les causes de cette hétérogénéité des courbes de survie à la température supra-optimale.

3°) Etude de la fraction thermorésistante : La cassure des courbes de survie traduit-elle une hétérogénéité génétique ?

La courbe biphasique que nous observons pour l'effet létal indique

Fig. 2 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de différentes souches haploïdes sauvages : les cultures en phase de croissance exponentielle sont lavées, transférées en YEP frais et incubées à 52°C.

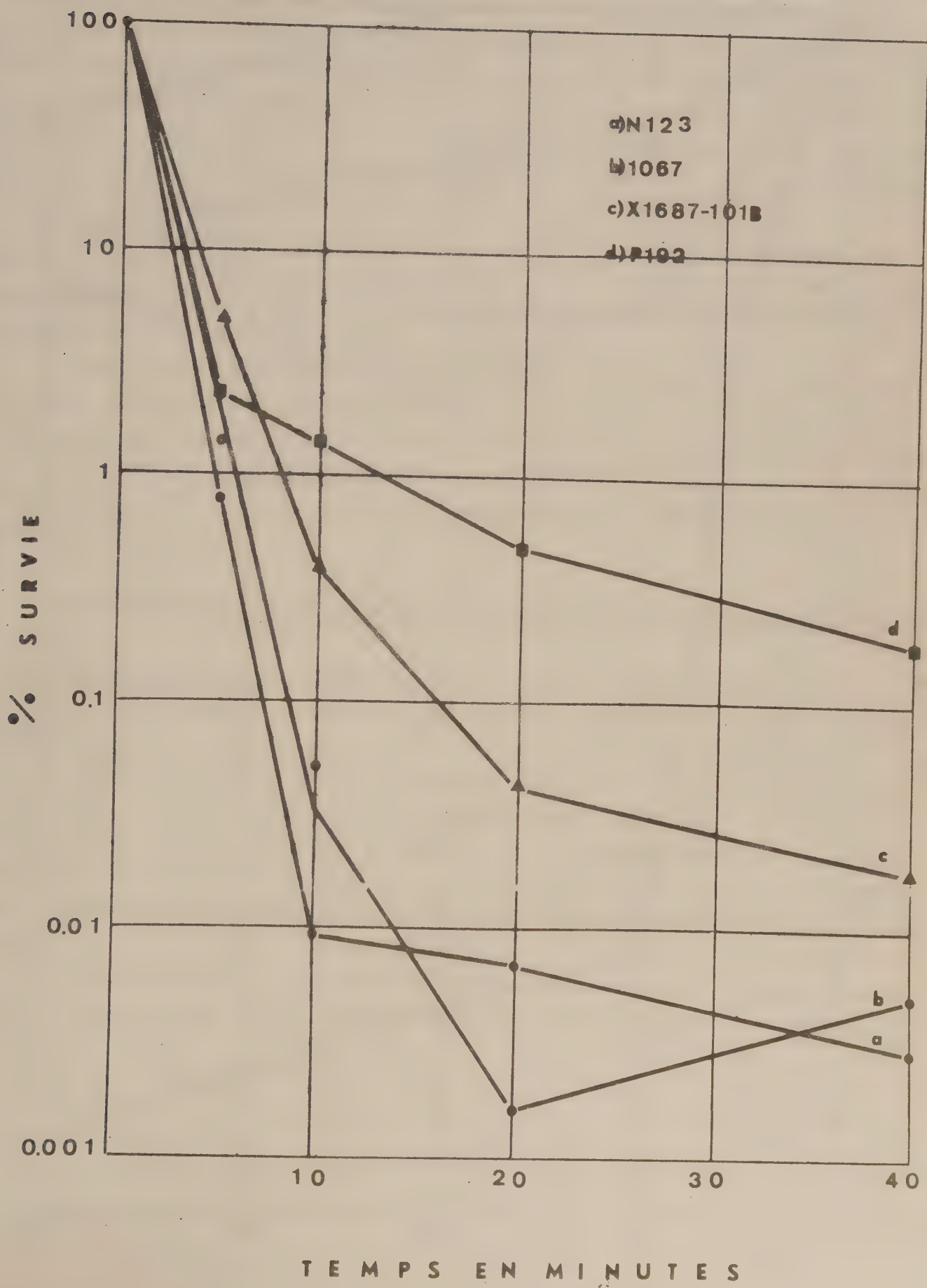
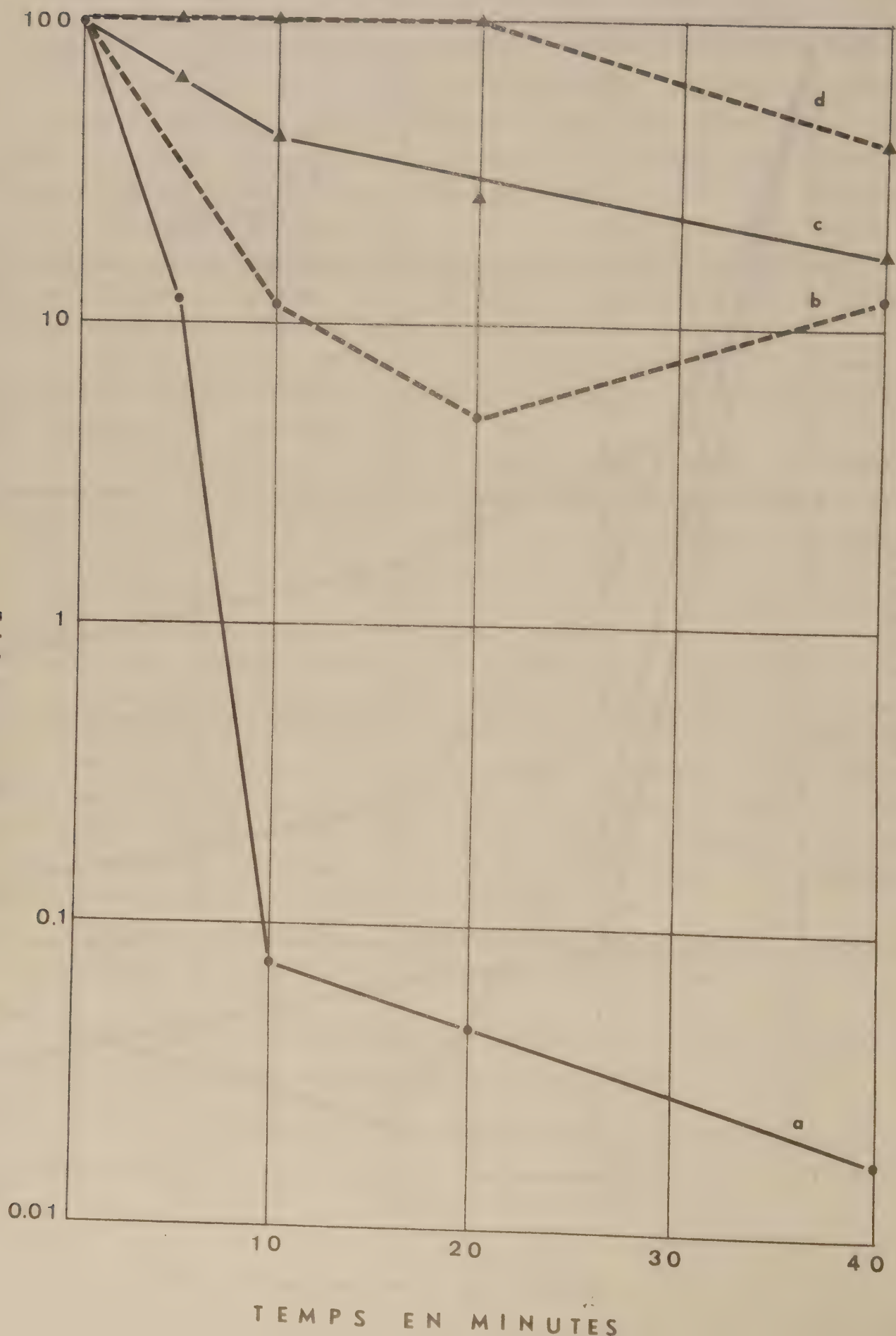


Fig. 3 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C d'une souche sauvage diploïde (ND) :

- a - étalement immédiat, culture traitée en croissance exponentielle
- b - étalement différé, culture traitée en croissance exponentielle
- c - étalement immédiat, culture traitée en croissance stationnaire
- d - étalement différé, culture traitée en croissance stationnaire



une hétérogénéité dans la population. Cette hétérogénéité peut être d'origine génétique ou phénotypique.

Pour distinguer entre ces deux possibilités, nous avons repiqué au hasard deux clones indépendants ayant survécu à 40 minutes d'incubation à 52°C (0,0028 % de survie). Après repiquage et mise en culture, nous avons pris les cellules en phase de croissance exponentielle, reproduit les conditions du premier chauffage et établi ainsi pour ces clones les courbes de survie à 52°C. Ces deux différents clones présentent approximativement la même courbe biphasique avec la cassure au même niveau (0,01 % de survie environ) que la population d'origine (fig. 4).

Ceci élimine la possibilité d'une hétérogénéité génétique. En effet, la cassure de la courbe de survie n'est pas due à la présence dans la population d'une fraction cellulaire génétiquement plus thermorésistante, que l'on aurait ainsi pu sélectionner.

Une telle hétérogénéité phénotypique à l'inactivation thermique doit donc être d'ordre physiologique et pourrait être liée à la phase de croissance dans laquelle se trouvent les cellules au moment du traitement.

Ce même type d'hétérogénéité non génétique vis-à-vis de la thermosensibilité a été trouvée pour des bactériophages (104-78), et pour des virus animaux (122).

4°) Influence de la phase de croissance sur la thermosensibilité

a) Courbe de croissance : Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance en milieu complet liquide à 28°C de la souche N 123 (type sauvage haploïde).

Nous avons suivi la croissance au cours du temps par différents moyens : par l'augmentation de la concentration cellulaire (dénombrement au microscope avec Cellule de Bürcker), par l'augmentation de la masse cellulaire (en mesurant la densité optique à 490 mμ) et par l'augmentation du nombre de colonies après étalement des cellules sur milieu complet solide.

Sur la figure 5, on voit la courbe de croissance obtenue en portant les logarithmes de ces différentes valeurs en fonction du temps.

Fig. 4 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de clones ayant survécu à un 1er traitement à 52°C : deux clones indépendants, survivant d'un 1er chauffage à 52°C (souche N 123 en croissance exponentielle) sont repiqués. Les cultures en croissance exponentielle sont soumises à un 2ème traitement à 52°C.

- a - survie de la population d'origine (1er chauffage)
- b - survie du clone 1 (2ème chauffage)
- c - survie du clone 2 (2ème chauffage)

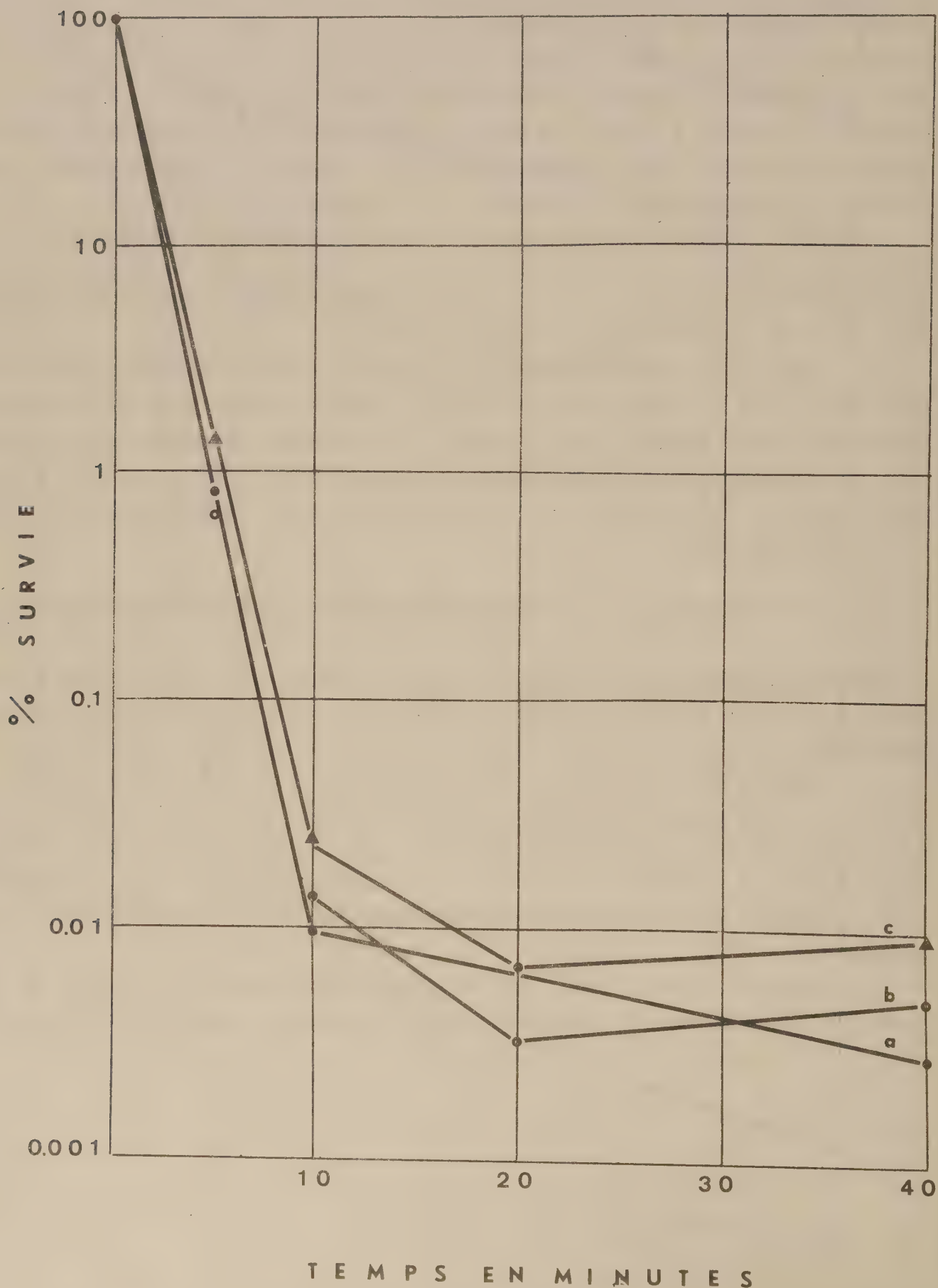
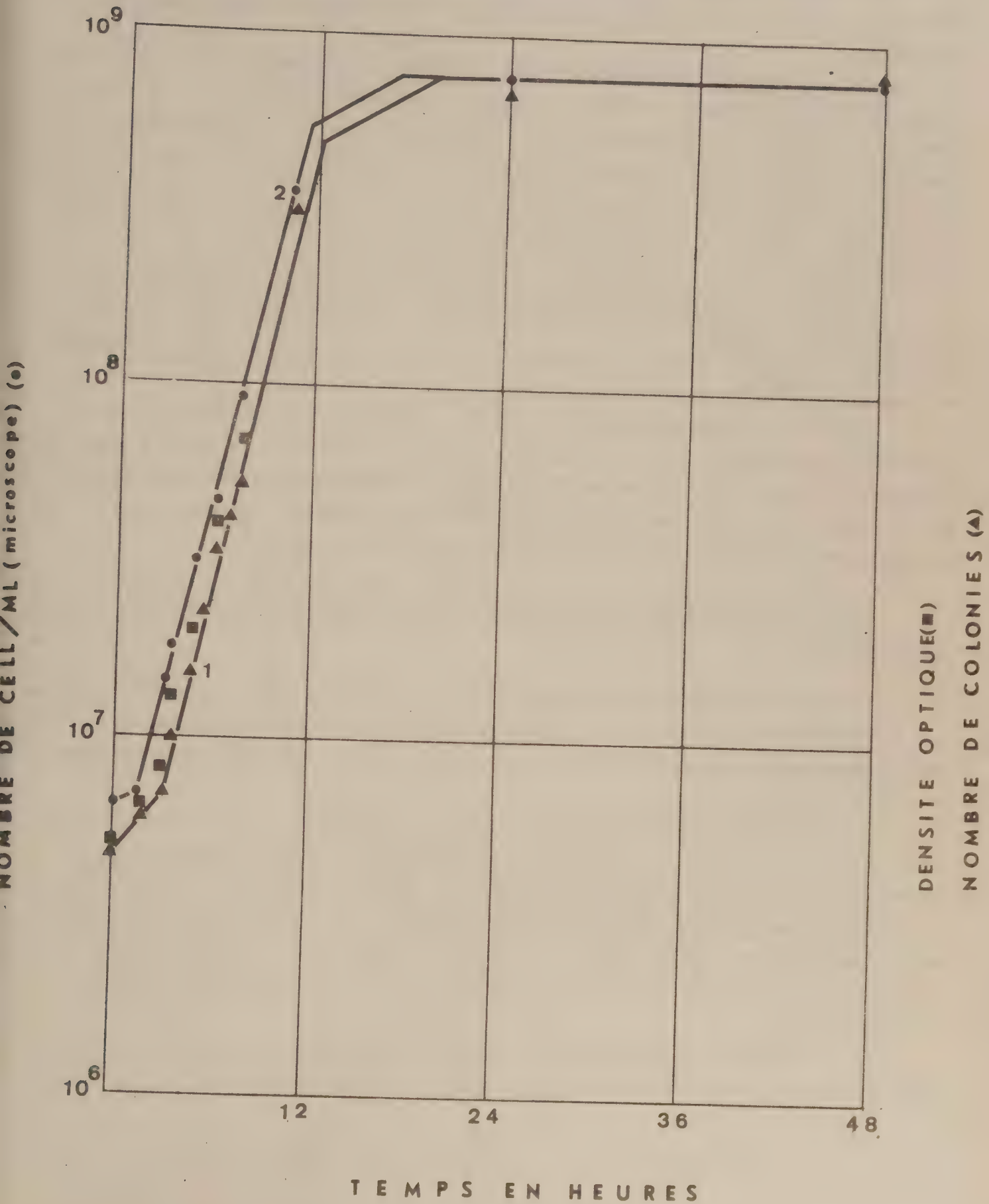


Fig. 5 : Croissance de la souche sauvage haploïde N 123 en YEP liquide : mesurée par la densité d'optique (■), le comptage au microscope (●) et l'étalement sur milieu YEP (▲). 1 et 2 se réfèrent aux moments où les cellules ont été prélevées pour le traitement à 52°C.



b) Thermosensibilité à différentes phases de la croissance : Ensuite, nous avons étudié comparativement la survie de cette souche à 52°C en la traitant à différentes phases de la croissance (points 1 et 2 sur la figure 5).

On trouve une différence très importante de sensibilité à la température supra-optimale, selon la phase de croissance des cellules au moment du traitement (figure 6). Les cellules en phase logarithmique de croissance présentent la courbe biphasique déjà décrite ; la 1ère partie est une exponentielle en fonction du temps de chauffage et l'extrapolation à l'axe des ordonnées de la 2ème partie ne correspond pas à la fraction des cellules à bourgeons présentes dans la population.

Lorsque les cellules sont traitées à 52°C en phase stationnaire de croissance, la courbe de survie présente un épaulement, suivi d'une partie linéaire. Le nombre d'extrapolation à l'axe des ordonnées devient nettement supérieur à 1 et varie avec l'âge de la culture.

Le facteur de modification de dose (FMD), calculé sur la partie linéaire des courbes (1ère partie des courbes cassées) est égal à environ 25 entre la phase stationnaire et la phase exponentielle de croissance. Le FMD est obtenu par le rapport des doses qui donnent la même survie, la courbe sigmoïde étant ajustée à l'intersection des axes.

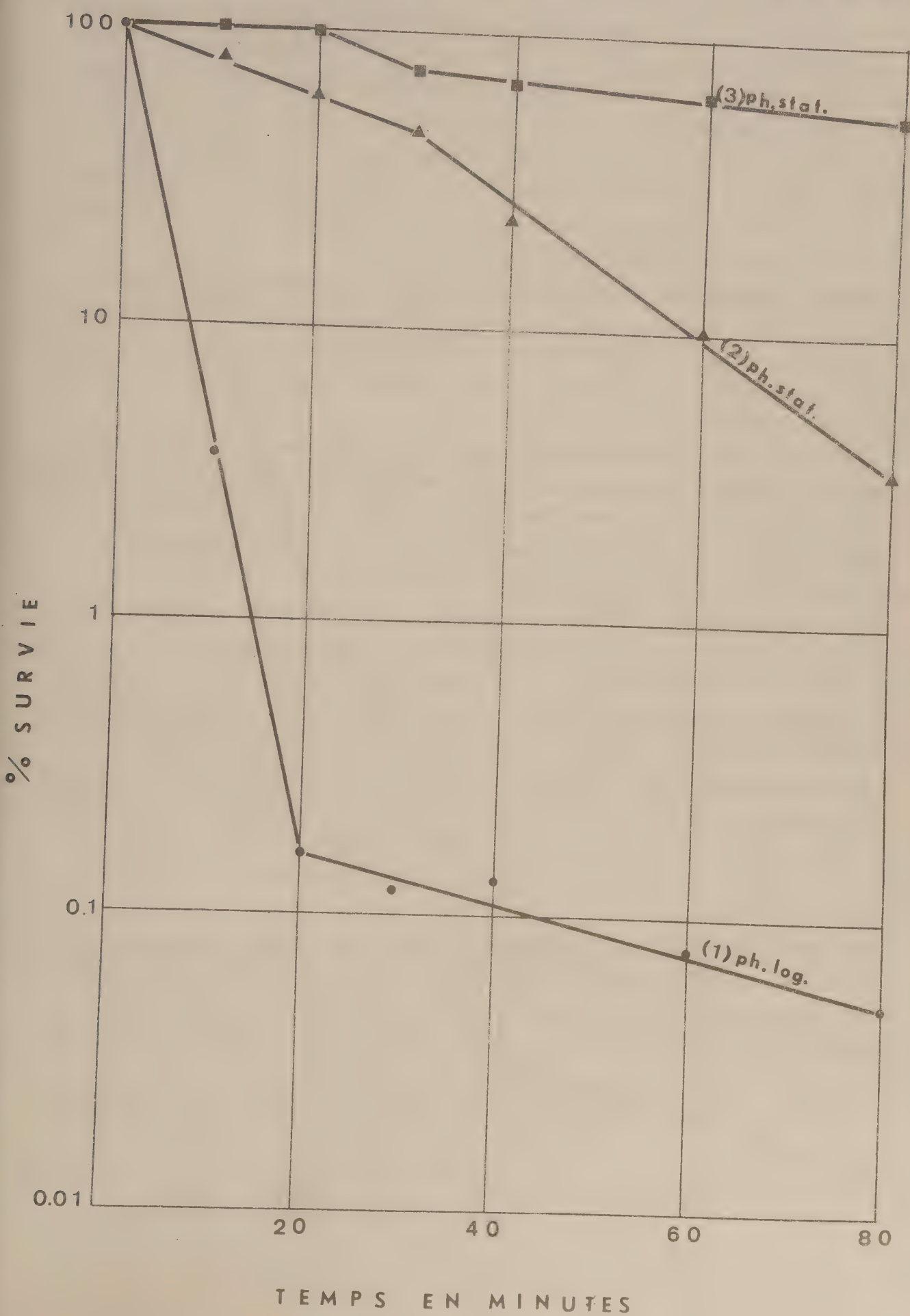
5°) Etude de l'inactivation à 52°C sur des cellules en croissance synchronisée

La différence de thermosensibilité que nous avons observée pour des cultures non synchrones en phase exponentielle ou stationnaire de croissance suggérerait que certaines phases du cycle cellulaire sont plus sensibles que d'autres.

Il paraissait donc utile d'étudier les effets de l'incubation à 52°C sur des cultures en croissance synchronisée. Nous avons adopté la technique de synchronisation de Mitchison (56), basée sur l'isolement, à partir d'une culture en phase exponentielle, de la fraction cellulaire sans bourgeons sur un gradient de densité, suivi de l'inoculation de ces cellules en milieu de croissance. Mitchison utilise des gradients de sucrose 10-40 %.

On constate que le simple contact des levures avec le sucrose pour le temps d'une séparation les rend plus résistantes à l'effet létal

Fig. 6 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C en relation aux différentes phases de la croissance : les courbes 1 et 2 correspondent aux stades de la croissance indiqués sur la figure 5 où les cellules sont prélevées, lavées et traitées à 52°C. La courbe 3 représente la survie de cette culture à 6 jours de croissance.



à 52°C. Sur la figure 7 sont représentées les courbes de survie à 52°C de deux fractions aliquotes d'une culture en phase de croissance exponentielle : l'une a été en contact avec le gradient de sucrose 10-40 % pendant le temps d'une centrifugation (30 minutes), l'autre sans sucrose constitue notre témoin. La différence est significative car nos points expérimentaux présentent une erreur standard de l'ordre de ± 5 %.

De même, vis-à-vis des rayons ultraviolets, le contact avec le sucrose dans de tels gradients entraîne une diminution de la radiosensibilité. Ceci a été vu sur *Schizosaccharomyces pombe* et sur *Saccharomyces cerevisiae* par mes collègues F. Fabre et R. Chanet.

Aussi, avons nous modifié la technique et remplacé le sucrose par le Ficoll. Le Ficoll est un haut polymère synthétique du sucrose. Il fournit des solutions de haute densité et de faible viscosité. Par rapport au sucrose, il présente l'avantage d'être inerte, avec une faible pression osmotique (100).

Sur la figure 8 on constate que le contact des levures avec le Ficoll pour le temps d'une séparation ne modifie pas leur thermosensibilité.

Nous avons donc par la suite séparé les types cellulaires au moyen de gradients de densité de Ficoll 15-30 %.

L'utilisation de cellules en phase de croissance exponentielle, comme le décrit Mitchison, présente plusieurs inconvénients : les proportions des cellules en bourgeons et en amas sont élevées et le rendement final en cellules isolées est faible. Aussi avons nous encore modifié la technique, en prenant des cellules en phase stationnaire précoce.

Les gradients sont préparés la veille de l'expérience et gardés à 4°C. On dépose avec précaution 2×10^9 cellules environ sur chaque gradient. Les gradients ainsi chargés sont centrifugés dans un rotor "Swing-out" jusqu'à ce que les cellules aient migré vers la moitié du tube (30 minutes, 600 g).

On prélève alors à la pipette Pasteur les bandes supérieures qui sont examinées séparément au microscope. Les fractions satisfaisantes (95 % au minimum de cellules isolées, sans bourgeons) sont mélangées et lavées 2 fois en solution saline à 9‰. On récupère approximativement 1 % des cellules initialement déposées sur le gradient.

Toutes ces manipulations sont faites à la température ambiante.

Fig. 7 : Effet du sucrose sur la thermo-sensibilité : Deux aliquotes d'une culture en phase de croissance exponentielle de la souche N123 sont soumises à l'incubation à 52°C
a - sans aucun pré-traitement
b - ayant au préalable été en contact avec un gradient de densité de sucrose 10-40 % pour 30 minutes.

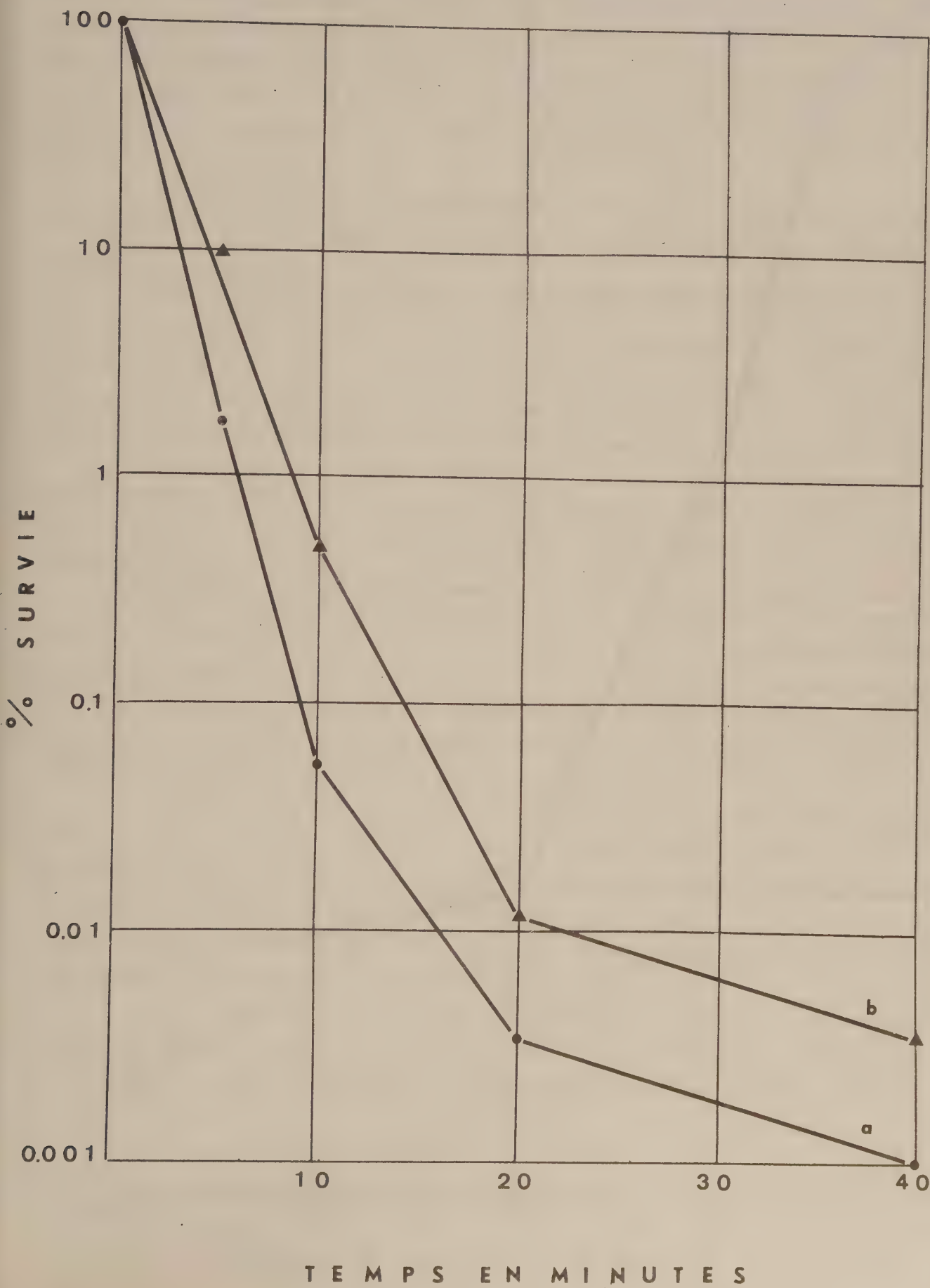
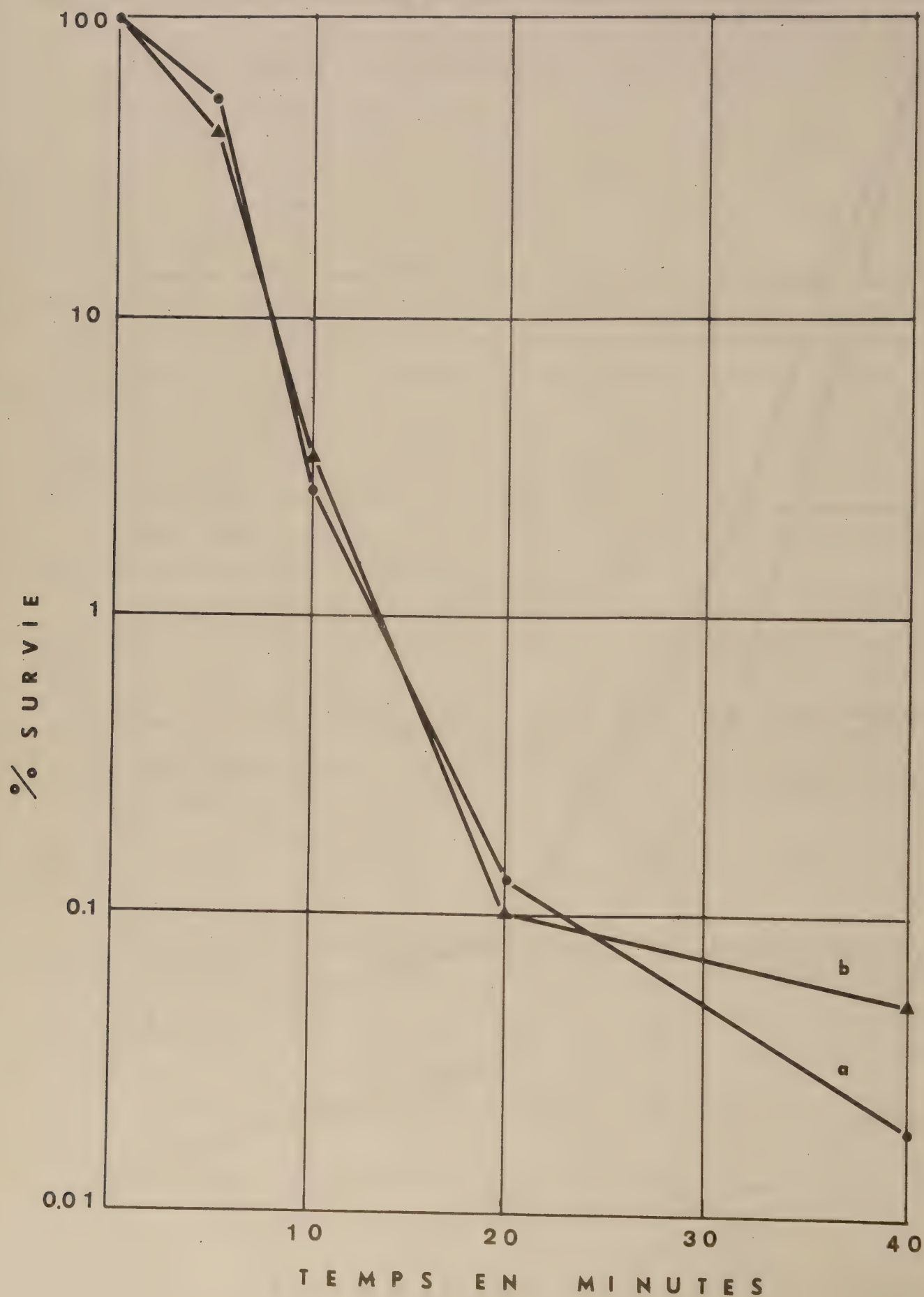


Fig. 8 : Effet du Ficoll sur la thermosensibilité : deux aliquotes d'une culture de N 123 en phase de croissance exponentielle sont soumises à 52°C

a - sans aucun pré-traitement

b - ayant au préalable été en contact avec un gradient de densité de Ficoll 15-30 % pour 30 minutes.



La fraction de cellules rondes sans bourgeons ainsi séparée est inoculée dans du milieu complet liquide à la concentration d'environ 1×10^7 cell/ml ; cette culture est incubée à 28°C avec une aération permanente. La croissance est suivie par dénombrement des différentes catégories cellulaires par comptage au microscope à l'aide d'une Cellule de Bürcker en fonction du temps. Une levure en début de bourgeonnement est comptée pour deux. On a adopté ce mode de comptage car il a été démontré (118) que le doublement de l'ADN est concomitant de la formation du bourgeon.

Tout au long de la croissance, des parties aliquotes de la culture sont prélevées et soumises au traitement à 52°C, selon le procédé déjà décrit.

Sur la figure 9 on voit l'évolution de la dose létale 10 % au long du cycle cellulaire. La "dose" dans ce cas représente la durée du séjour en minutes à 52°C. Pour tracer la courbe de croissance, le logarithme du nombre total de cellules est porté en fonction du temps. On voit encore sur la figure le nombre de cellules à bourgeons en fonction du temps.

La valeur de la dose létale 10 % (DL_{10}) a été déterminée à l'aide des résultats portés sur la figure 10. Celle-ci montre les courbes de survie à 52°C obtenues pour les cellules à différents moments du cycle cellulaire.

La sensibilité à l'effet létal de l'incubation à 52°C varie le long du cycle cellulaire (fig. 9). La DL_{10} décroît rapidement lorsque les cellules s'approchent du moment d'initier la division cellulaire et atteint un minimum lors du bourgeonnement. Quand les cellules terminent le cycle et entrent en interphase, on observe une remontée de la DL_{10} , les cellules deviennent à nouveau plus résistantes.

La variation de la thermosensibilité n'est cependant pas du même ordre de grandeur que celle observée pour des populations non synchrones en phase exponentielle ou stationnaire de croissance. Bien que le maximum de sensibilité soit atteint lors du bourgeonnement, comme nous le suggéreraient les expériences sur les cultures non synchrones, le FMD est beaucoup moins important à l'intérieur d'un cycle.

Ceci nous indique que les changements de pente et de forme de la courbe de survie à 52°C lorsque les cellules arrivent en phase stationnaire de croissance, reflètent d'autres phénomènes que le simple arrêt de la

Fig. 9 : Effet létal et mutagène cytoplasmique du chauffage à 52°C sur des cellules synchronisées (souche N 123). La croissance en fonction du temps (heures) est représentée par : (■) le logarithme du nombre total de cellules, (●) le pourcentage de cellules à bourgeon. Les courbes en pointillé représentent la DL_{10} et la DM_{20} pour les stades I à VI du cycle cellulaire.

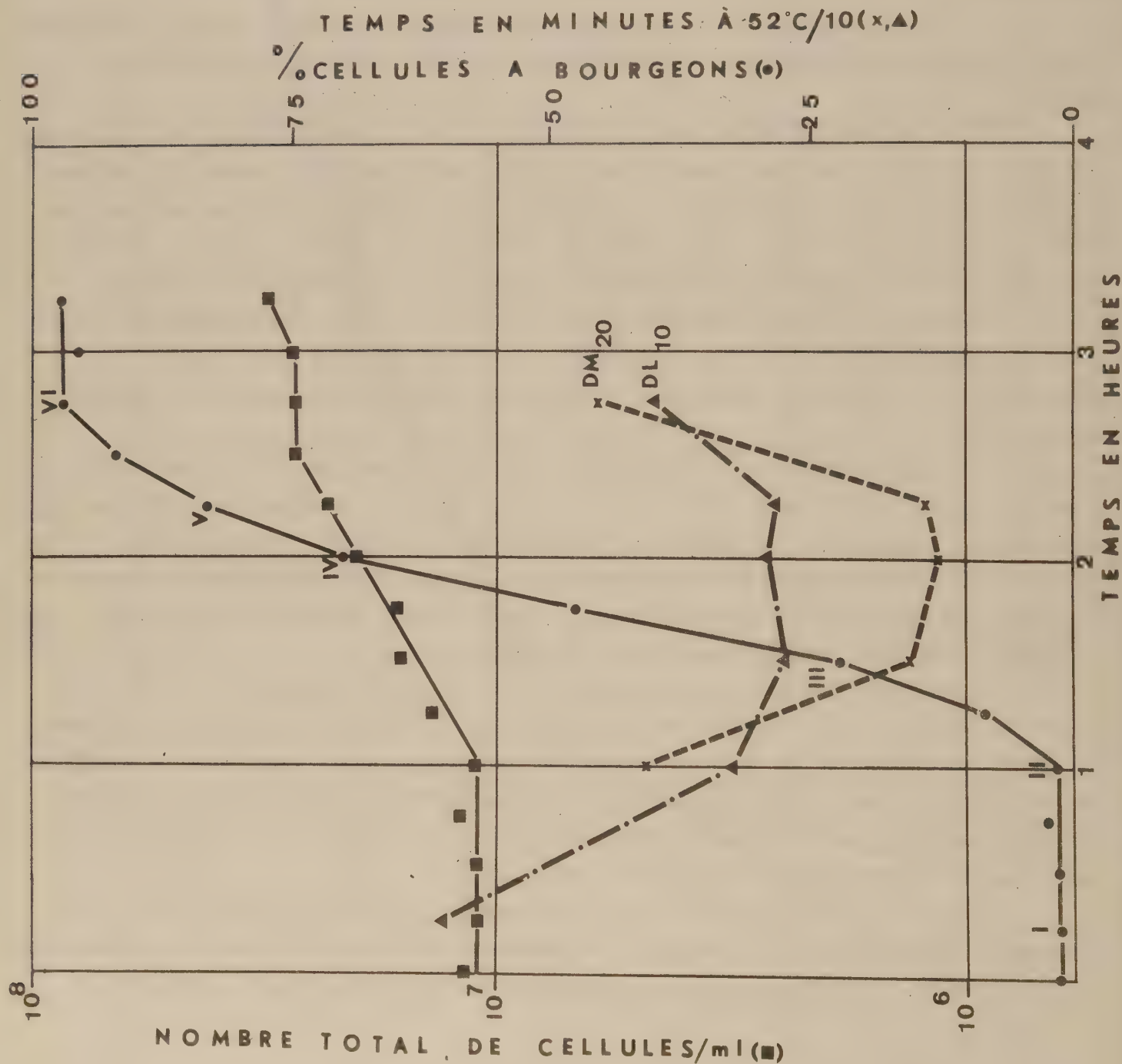
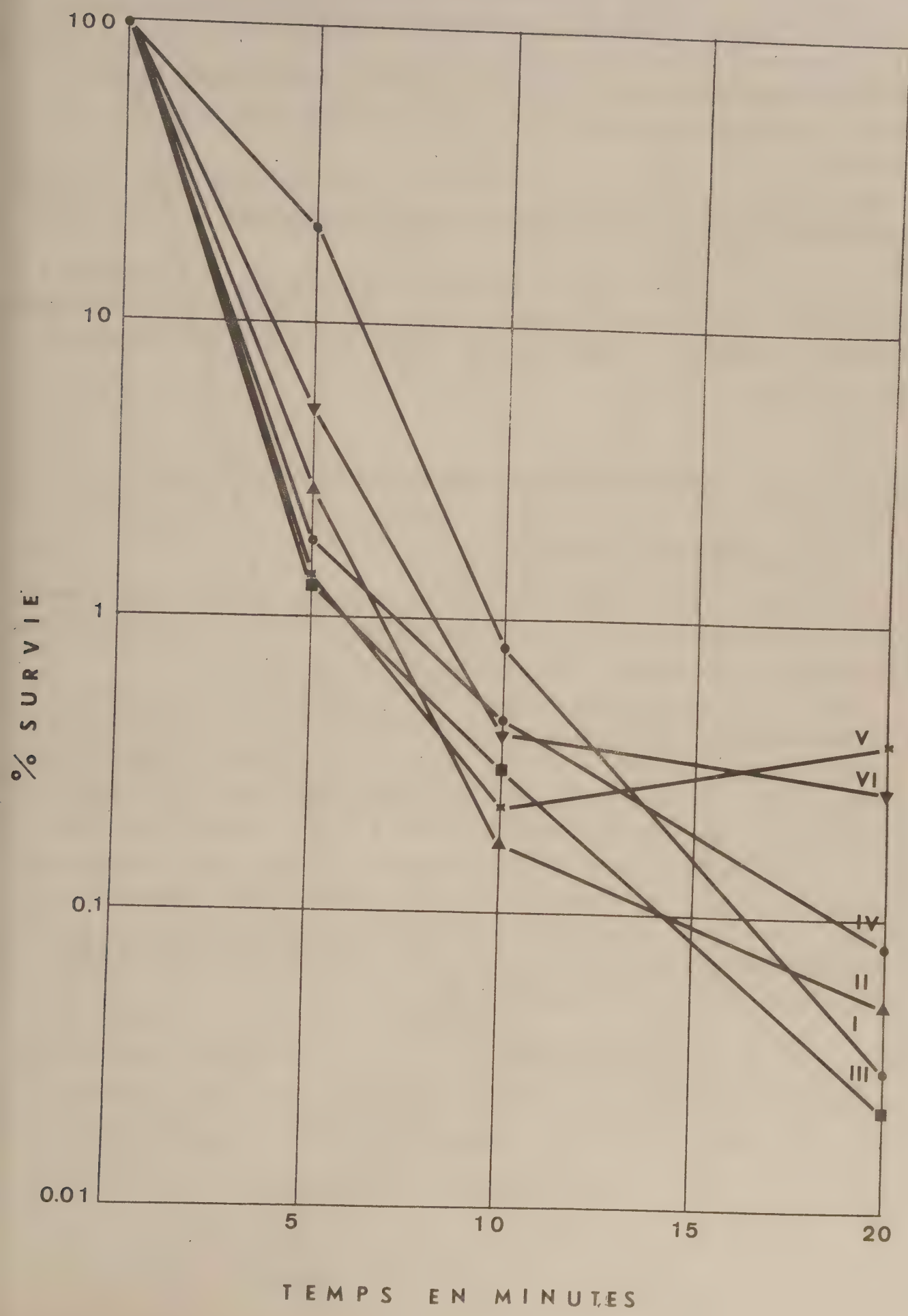


Fig. 10 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de la souche N 123 à différents moments du cycle cellulaire : I à VI se réfèrent aux moments du cycle cellulaire auxquels les cellules ont été chauffées (voir fig. 9).



division cellulaire. La phase stationnaire n'est qu'en partie comparable à une interphase ; elle est conditionnée par l'épuisement du milieu de croissance, qui entraîne l'arrêt des divisions nucléaires et cellulaires. De plus, par rapport à la phase de croissance exponentielle, des modifications métaboliques importantes dans les "pools" d'acides-amino et de nucléotides, dans la composition de la membrane cellulaire, etc..., ont été décrites.

Dans les conditions de synchronisation, les cellules sont toujours en phase exponentielle, il n'y a pas de stade correspondant parfaitement à la phase stationnaire.

En résumé, le fait notable de cette étude est que la sensibilité maximale à 52°C coïncide avec le moment où a lieu la formation du bourgeon événement qui, comme on l'a déjà vu (118), est concomitant de la phase de synthèse de l'ADN.

B - REPARATION DE L'EFFET LETAL DE LA TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE

1°) Description de l'effet

Les lésions létales dues à l'incubation à des températures supra-optimales sont réparables dans le cas des bactéries (*Staphylococcus aureus* (37), *Salmonella thyphimurium* (112), *Escherichia coli* (62)).

Aussi, on s'est demandé si pour *Saccharomyces cerevisiae* les lésions létales de 52°C sont également réversibles.

Les levures traitées à 52°C en phase de croissance exponentielle sont lavées 2 fois par centrifugation puis conservées dans un milieu où la croissance n'a pas lieu (eau bidistillée) à 28°C, avec une aération permanente. Au bout de 5 jours de conservation, on étale les cellules sur milieu complet solide. Cet étalement est dit "différé" par rapport à l'étalement "immédiat", effectué tout de suite après le traitement à 52°C.

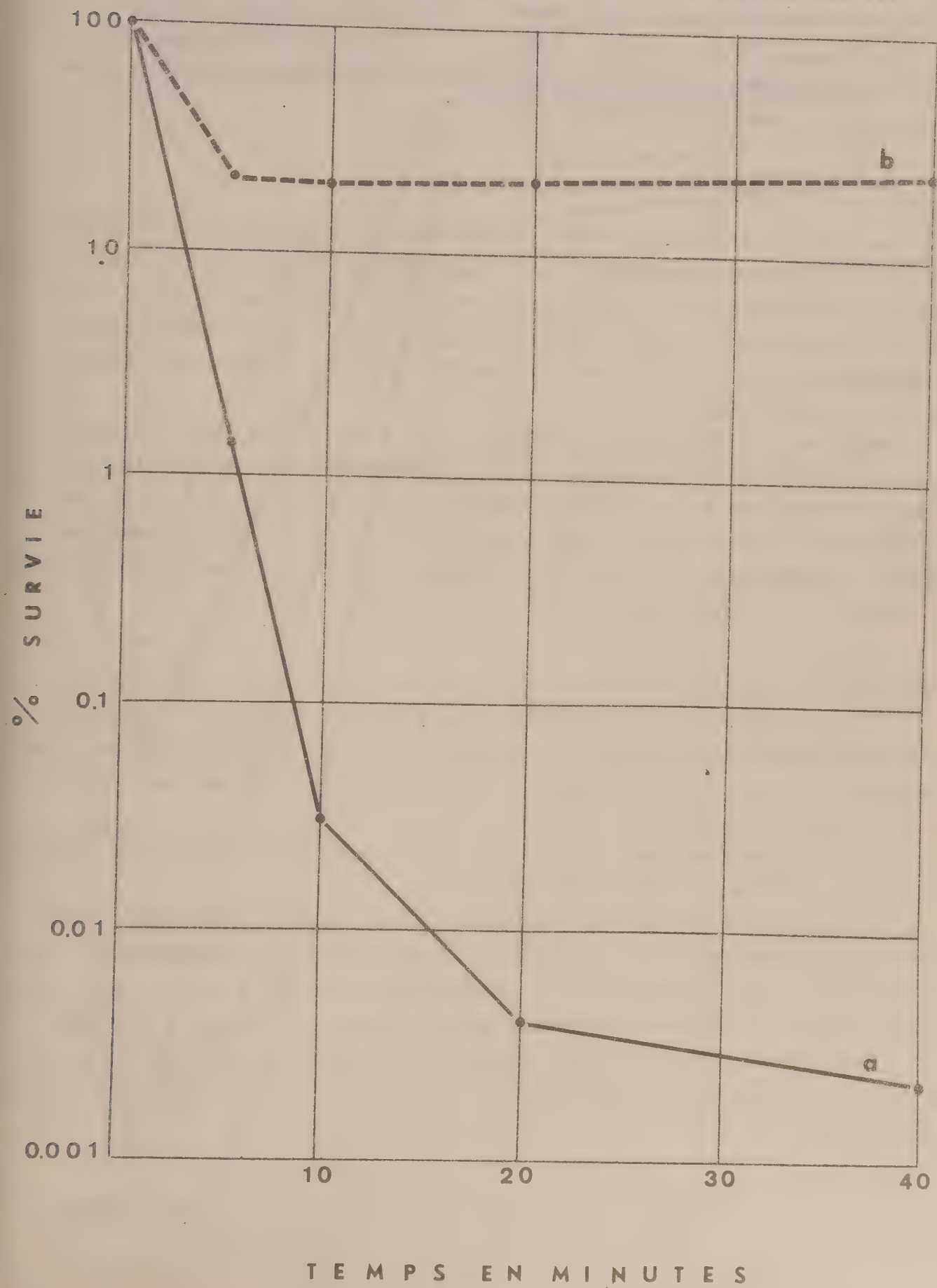
La concentration cellulaire pendant la période de conservation pour l'étalement différé est comprise entre 1×10^7 et 1×10^8 cell/ml.

La figure 11 représente une expérience type, avec la courbe de survie obtenue par étalement immédiat et la courbe de survie après étalement différé. On constate que le secteur réparable est très important. La courbe d'étalement différé est complexe. Là où en étalement immédiat

Fig. 11 : Réparation de l'effet létal de 52°C pour des cellules en phase de croissance exponentielle (souche N123) :

a - cellules étalées sur YEP immédiatement après le traitement à 52°C

b - cellules traitées à 52°C, puis gardées pendant 5 jours dans de l'eau bidistillée à 28°C avec aération avant d'être étalées sur YEP



on observe 0,01 % de survivants, l'étalement différé montre 20 % de survie.

En phase stationnaire de croissance, nous avons aussi trouvé une réparation pour cette souche haploïde.

La réparation de l'effet létal de 52°C existe aussi chez une souche sauvage diploïde, en phase exponentielle et également en phase stationnaire de croissance (figure 3).

2°) Caractères de la réparation

De façon à mieux comprendre la nature de la réparation observée pour l'effet létal du chauffage, nous avons, d'une part fait une étude cinétique de la réparation, et, d'autre part entrepris une série d'expériences en examinant l'action sur cette réparation d'inhibiteurs connus de la réparation des radiolésions. Cette dernière se réalise par des processus enzymatiques (89).

Dans les conditions expérimentales où nous constatons la réparation des thermolésions, les cellules sont conservées dans du milieu frais, différent de celui où elles ont été chauffées. La réassimilation de produits lâchés par les cellules sous l'effet du chauffage sur la membrane cellulaire, comme cela se produit pour *Staphylococcus aureus* (37), ne peut donc expliquer la réparation observée.

a) Cinétique de la réparation

Si des prélèvements sont effectués à divers temps de conservation après le traitement thermique, on constate que le nombre de cellules viables augmente en fonction du temps puis atteint un palier au bout de 2 à 5 jours suivant les souches.

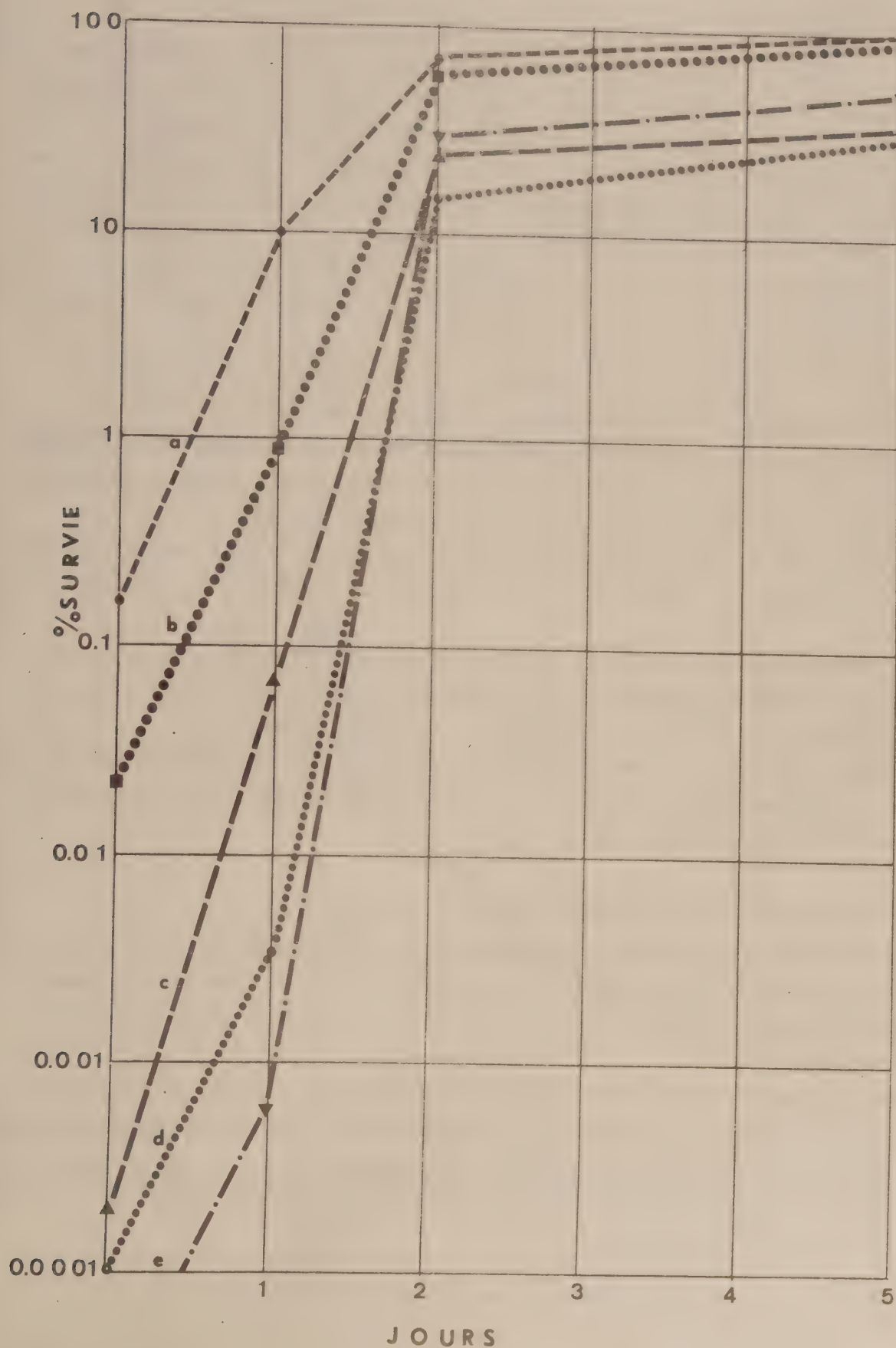
Cette étude cinétique a été faite pour différents temps de traitement à 52°C (différents niveaux de survie).

On constate que plus le traitement thermique est prolongé, plus la pente de la 1ère partie de la courbe de réparation en fonction du temps est forte (fig. 12). Autrement dit, la restauration est d'autant plus rapide que le nombre de lésions produites par l'action thermique est élevé.

Ceci semble paradoxal mais pourrait suggérer une induction d'enzyme de réparation par les thermolésions. Cet aspect sera discuté ultérieurement (pages 44,46).

Fig. 12 : Cinétique de la réparation d'une culture traitée à différents temps à 52°C en phase de croissance exponentielle : Etalement sur YEP de fractions aliquotées en fonction du temps de conservation en eau bidistillée à 28°C avec aération, après traitement à 52°C.

- a - cellules portées 10 minutes à 52°C
- b - cellules portées 20 minutes à 52°C
- c - cellules portées 40 minutes à 52°C
- d - cellules portées 60 minutes à 52°C
- e - cellules portées 80 minutes à 52°C



Un tel effet de "dose" dans la réparation des thermolésions a été vu pour *Escherichia coli* (62).

b) Effet du froid

Dans le but d'examiner la possibilité d'un contrôle métabolique de la réparation, nous avons étudié l'influence de la température au cours de la période d'incubation en eau bidistillée après le traitement à 52°C.

Pour une souche sauvage haploïde traitée à 52°C en phase de croissance exponentielle, nous avons comparé la réparation pour deux fractions aliquotes conservées dans différentes conditions. La 1ère fraction a été maintenue pendant 5 jours en eau bidistillée, avec aération, à 28°C, avant l'étalement différé ; la 2ème fraction est restée pendant 5 jours en eau bidistillée, avec aération, à 4°C.

La figure 13 montre les courbes de survie immédiate, différée à 28°C et différée à 4°C. On constate que l'incubation à 4°C empêche la réparation des lésions létales du chauffage à 52°C. Elle tend même à diminuer la viabilité, ce qui correspond à la situation dite "liquid holding recovery" négatif qui existe pour les radiolésions (61-69).

Il convient de faire remarquer que pour les cellules non traitées à 52°C, il n'y a pas de changement de la viabilité pendant le stockage à 4°C.

La réparation des lésions produites par le chauffage à 52°C est donc thermo-dépendante, ce qui incite à penser que les processus engagés dans cette réparation sont probablement de nature enzymatique.

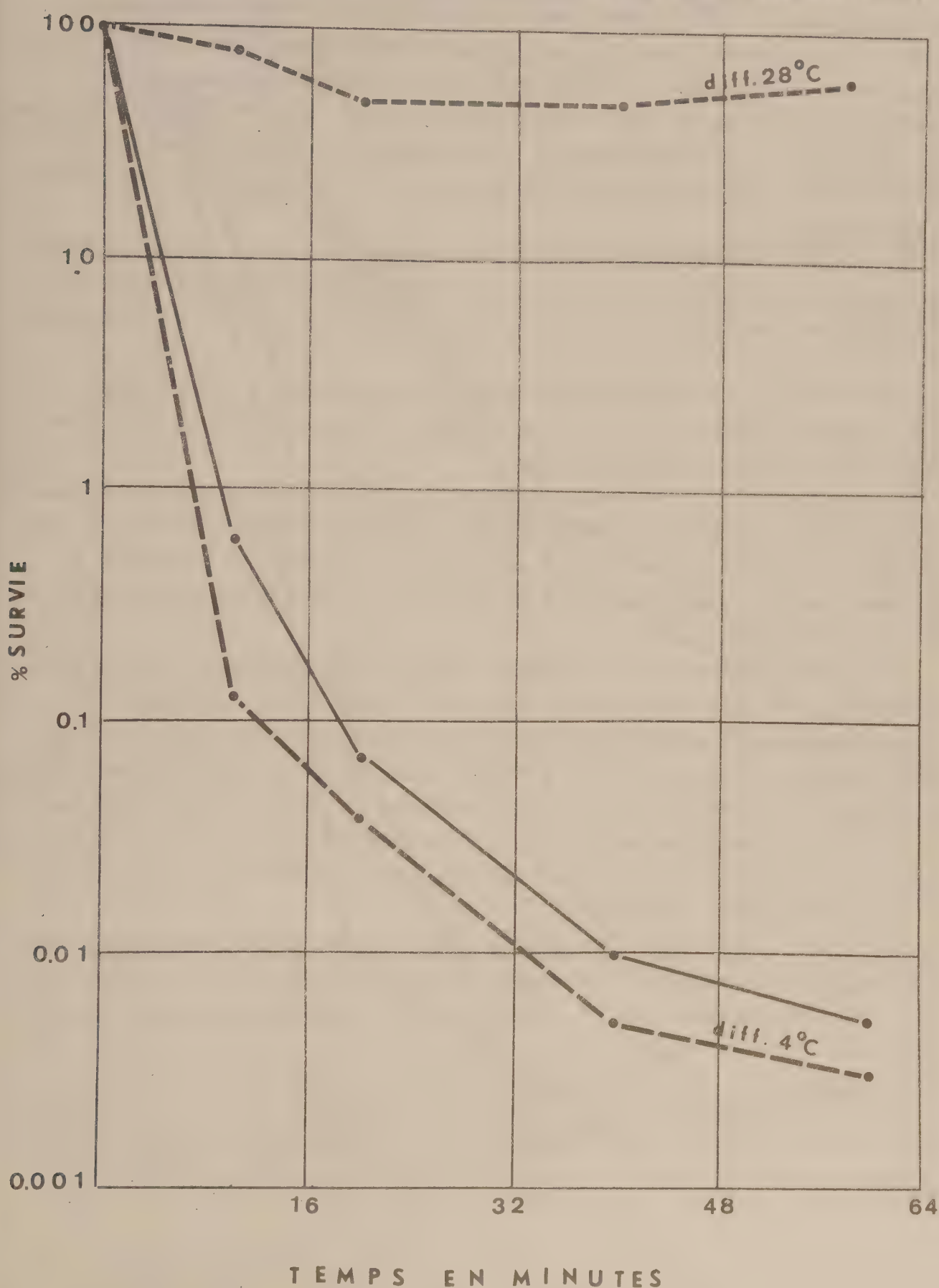
Le même phénomène d'inhibition par le froid de la réparation de l'effet léthal du chauffage à 52°C a été trouvé sur *Escherichia coli* (62) et sur *Staphylococcus aureus* (37).

c) Effet du blocage de la synthèse protéique nucléaire

La thermosensibilité de la réparation des lésions de 52°C ayant suggéré l'engagement d'une ou plusieurs enzymes dans le processus, nous avons examiné quel est l'effet du blocage de la synthèse protéique sur cette réparation.

Pour ce faire, nous avons examiné l'effet de la cycloheximide (CH) sur la réparation. Chez la levure, la cycloheximide à de faibles concentrations ne bloque que la synthèse protéique commandée par le noyau (99).

Fig. 13 : Influence de la température de post-incubation sur la réparation des thermolésions : les cellules traitées à 52°C en phase de croissance exponentielle sont étalées sur YEP : (—) immédiatement ; (---) après 5 jours de conservation en eau bidistillée à 28°C avec aération ; (— · — · —) après 5 jours de conservation en eau bidistillée à 4°C avec aération.



c1) Effet de la cycloheximide pendant la conservation en eau bidistillée : Une souche sauvage haploïde en croissance exponentielle est soumise au traitement à 52°C. Pour chaque temps de chauffage, on procède d'une part à l'étalement immédiat et, d'autre part deux fractions aliquotes sont conservées différemment pour l'étalement différé. La 1ère de ces fractions est conservée en eau bidistillée, à 28°C, avec aération, la 2ème dans une solution de cycloheximide à la concentration de 1 µg/ml, à 28°C avec aération. Au bout de 5 jours, on procède à l'étalement de ces différentes suspensions.

On observe que le blocage de la synthèse protéique après le chauffage empêche la réparation (fig. 14,c). Il convient de signaler que pour les cellules non chauffées, il n'y a pas de mortalité dans ces conditions.

c2) Effet de la pré-incubation en cycloheximide : Nous avons d'autre part, examiné l'effet sur la réparation d'un blocage de la synthèse protéique avant le traitement à 52°C.

Les cellules en croissance exponentielle sont incubées en présence de cycloheximide à la concentration finale de 1 µg/ml dans du milieu complet, pendant une génération. Elles sont ensuite lavées et traitées à 52°C en même temps que des cellules de la même culture n'ayant pas été en contact avec l'antibiotique.

Pour chaque temps de chauffage, une fraction aliquote est étalée immédiatement ; une autre est conservée pour l'étalement différé.

Les courbes de survie immédiate (fig. 14 a,b) montrent qu'il y a une nette protection vis-à-vis de l'effet létal à 52°C, lorsque les cellules ont été pré-incubées avec la cycloheximide. Le FMD est de 2 environ. On note qu'un épaulement apparaît dans la courbe de survie des cellules incubées avec la cycloheximide avant le traitement thermique et qu'il y a également un changement de pente.

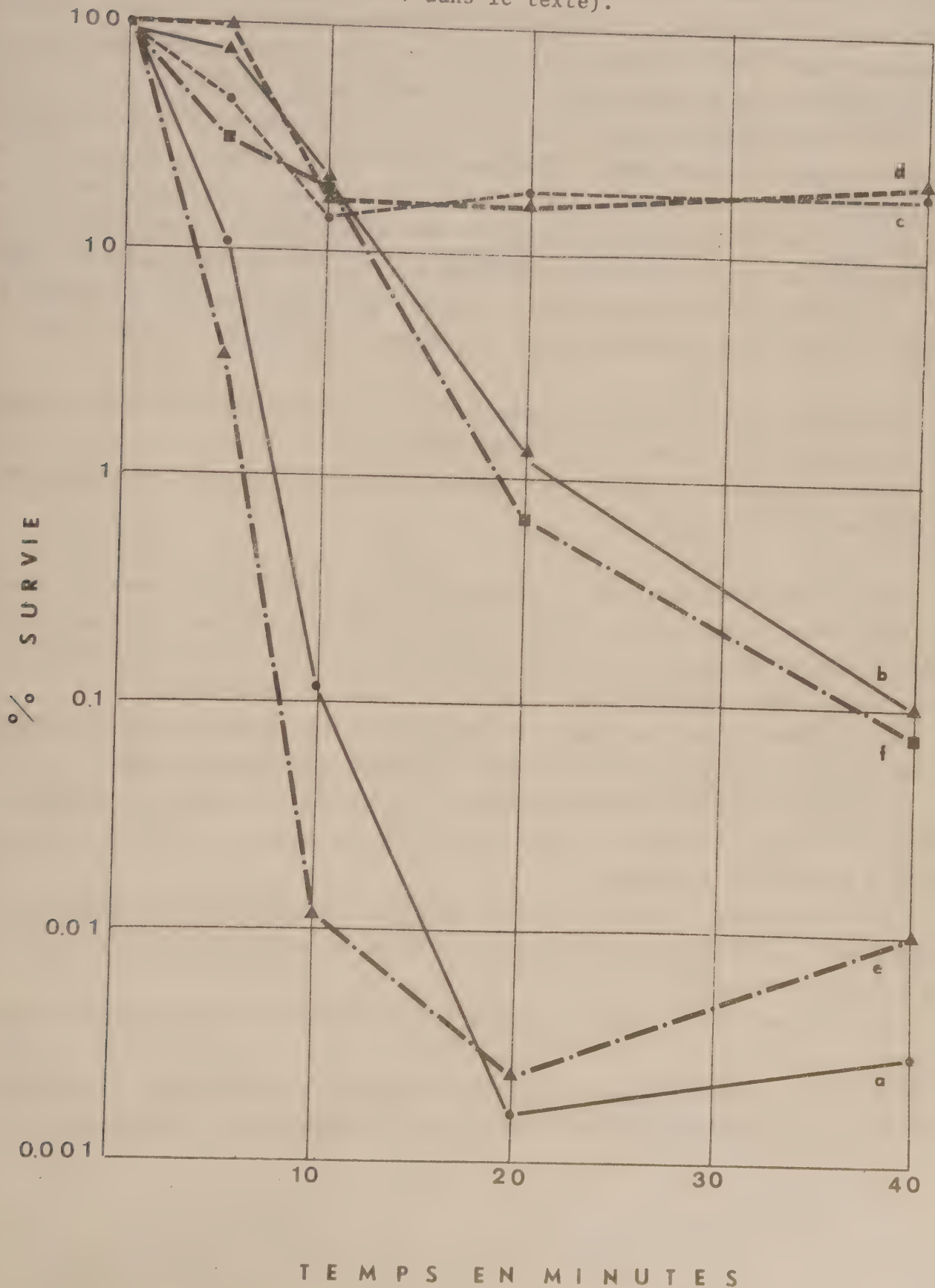
Ceci peut s'expliquer en partie par le plus grand pourcentage de cellules en bourgeonnement présenté par la culture témoin (94 %) par rapport à la culture inhibée (66 %), pour laquelle la croissance est nettement ralentie.

Par ailleurs, nous avons effectué des dosages d'ADN de cellules en croissance exponentielle soumises ou non au blocage par la cycloheximide. La méthode colorimétrique à la diphénylamine de Schneider et Burton a été utilisée (91-10).

Fig. 14 : Effet de la cycloheximide sur la réparation de l'effet létal de 52°C : Les cellules (souche N123) traitées à 52°C en croissance exponentielle, sont étalées sur YEP :

- a - immédiatement
- b - pré-traitées à la CH (1 $\mu\text{g/ml}$), étalées immédiatement
- c - conservées en eau, étalées 5 jours après
- d - pré-traitées à la CH (1 $\mu\text{g/ml}$), conservées en eau, étalées 5 jours après
- e - conservées en CH (1 $\mu\text{g/ml}$), étalées 5 jours après
- f - pré-traitées à la CH (1 $\mu\text{g/ml}$), conservées en CH (1 $\mu\text{g/ml}$), étalées 5 jours après.

(Voir tableau N° 1 dans le texte).



Nos résultats montrent qu'il y a environ 1,3 fois plus d'ADN par cellule lorsqu'il y a eu le blocage de la synthèse protéique.

Ce facteur s'ajouterait donc à la plus faible proportion de cellules à bourgeons pour provoquer une résistance accrue au traitement à 52°C des cellules inhibées, par rapport aux non bloquées. En effet, Wood (124) a montré que les cellules diploïdes sont plus résistantes que les cellules haploïdes à l'effet létal de la température de 52°C.

Ces résultats indiquent que l'effet protecteur du pré-traitement à la cycloheximide trouvé pour l'étalement immédiat pourrait être dû à un retard dans la division. Ceci permettrait une meilleure réparation sur le milieu solide. En effet, si les cellules non traitées à l'antibiotique ont le temps nécessaire pour subir le maximum de réparation (étalement différé), on reproduit un état équivalent à celui des cellules pré-traitées à la cycloheximide ; on retrouve alors les mêmes courbes de survie (fig. 14,c,d).

Pour *Escherichia coli* traitée à 52°C, une diminution de la réparation a été décrite dans ces conditions (62).

Sur le tableau 1 (voir page suivante), on a résumé les résultats de la figure 14.

c3) Etude cinétique de l'action de la cycloheximide sur la réparation : Pour mieux comprendre l'inhibition de la réparation par la cycloheximide ajoutée au milieu de conservation (1 µg/ml) pour l'étalement différé, nous avons réalisé une étude cinétique du phénomène.

La figure 15 montre que l'inhibition de la réparation de l'effet létal de 52°C est progressive au cours du temps de conservation.

Lorsqu'on ajoute la cycloheximide au cours du temps, la réparation déjà faite se maintient, mais il n'y a plus aucune réparation supplémentaire à partir de ce moment.

Ces résultats indiquent qu'une synthèse protéique nécessaire pour la réparation a lieu tout au long des 5 jours de maintien en milieu liquide des cellules traitées.

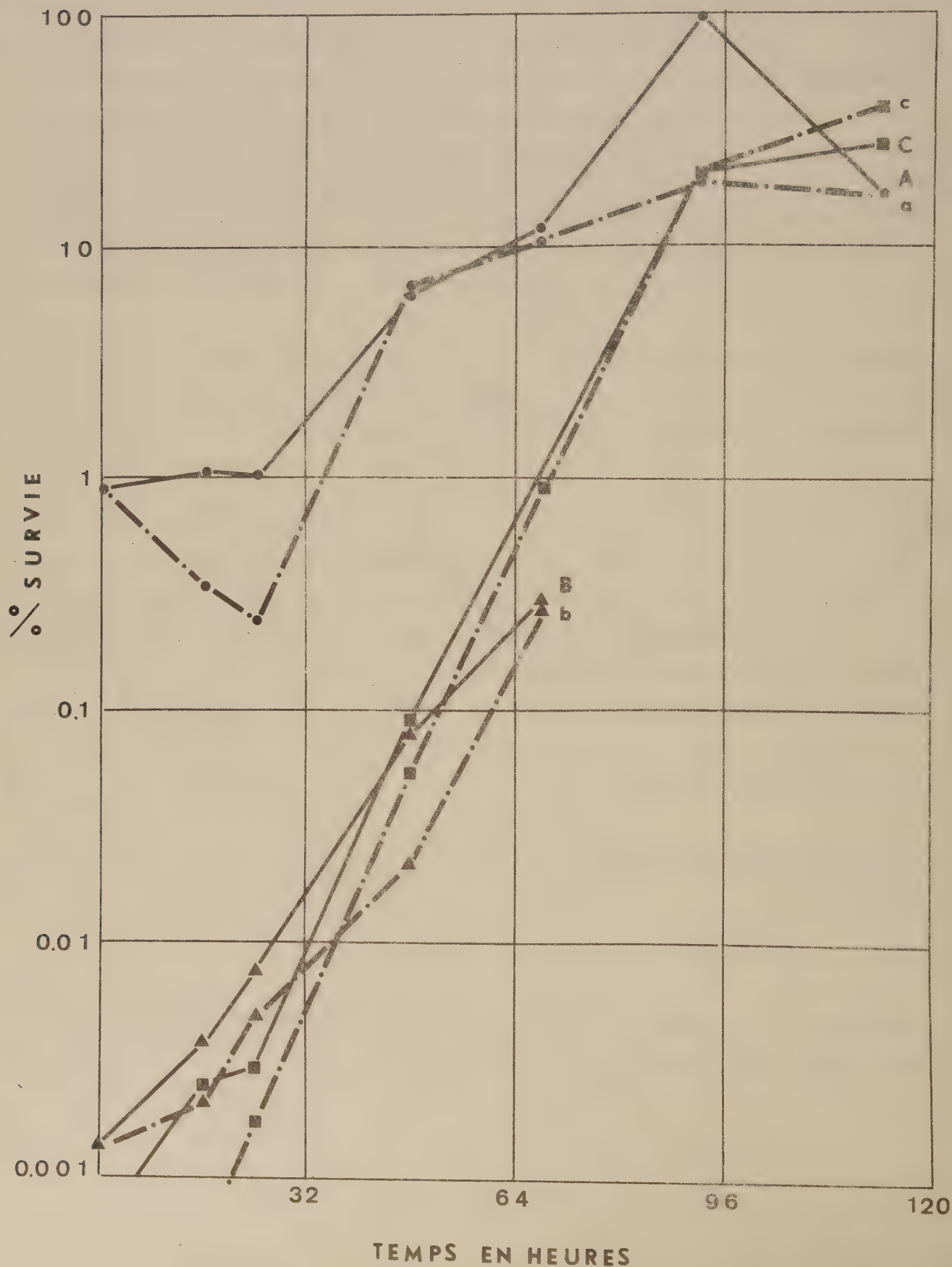
Deux hypothèses au moins peuvent expliquer cet effet de la cycloheximide :

- 1 - Une protéine pré-existante dans les cellules au moment du traitement thermique est thermo-labile. Pour que la réparation s'effectue, elle

Tableau 1

<u>Culture</u>	<u>Survie immédiate</u>	<u>Traitement durant le</u> <u>maintien en milieu</u> <u>liquide</u>	<u>Survie</u> <u>différée</u>
sans CH	normale (a)	sans CH	réparation (c)
sans CH	normale (a)	avec CH	pas de réparation (e)
avec CH	augmentée (b)	sans CH	réparation (d)
avec CH	augmentée (b)	avec CH	pas de réparation (f)

Fig. 15 : Cinétique de l'inhibition de la réparation des effets létaux de 52°C par la cycloheximide ajoutée au milieu de conservation pour l'étalement différé. La CH (1 µg/ml) est ajoutée à différents temps au cours des 5 jours de conservation en eau bidistillée des cellules (souche N 123) ayant subi le traitement à 52°C. L'étalement des cellules gardées en eau est fait à ces différents temps (—, A,B,C). L'étalement des cellules gardées en CH (1 µg/ml) est fait au bout de 5 jours (---, a,b,c)
A,a - cellules portées 5 minutes à 52°C
B,b - cellules portées 20 minutes à 52°C
C,c - cellules portées 40 minutes à 52°C



devrait être resynthétisée. Cette synthèse serait bloquée par la cycloheximide.

- 2 - Les thermolésions induisent elles-mêmes la synthèse d'une protéine nécessaire à leur réparation et la cycloheximide agirait en inhibant cette synthèse induite.

Dans l'état actuel de ce travail, il est difficile d'opter pour l'une ou l'autre hypothèse.

Nos résultats sur l'effet du froid, d'une part, et de l'action de la cycloheximide, d'autre part, sur la réparation de l'effet létal à 52°C, agissant après le chauffage, soulignent la nécessité d'un mécanisme protéique pour que cette réparation se réalise. D'après la spécificité d'action de la cycloheximide, on peut se demander que la (ou les) protéine(s) en cause est (ou sont) d'origine nucléaire.

Pour approfondir le mécanisme de la réparation, il faudrait, entre autres, utiliser des analogues d'acides aminés et de bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques, Ceci n'a pas été fait par défaut de temps.

C - EFFET MUTAGENE DE L'INCUBATION A 52°C

1 - Induction de mutants cytoplasmiques "petite colonie"

La mutation cytoplasmique "petite colonie" ou p^- se caractérise par la perte de l'aptitude respiratoire (20-102). Des altérations profondes de l'ADN mitochondrial sont associées à cette mutation pléiotropique (12-57).

a) Description de l'effet : Dans toutes les expériences décrites jusqu'ici pour l'effet létal, nous avons parallèlement examiné la fréquence de mutants cytoplasmiques "petite colonie" par la méthode de coloration au chlorure de triphényltetrazolium (67).

Comme plusieurs auteurs l'avaient déjà décrit pour différentes températures supra-optimales, nous avons constaté que l'incubation à 52°C induit des mutants déficients respiratoires "petite colonie" (20-102-122-68).

Sur la figure 16V on voit une courbe type d'induction de cette classe de mutants par l'incubation à 52°C. Pour tracer la courbe d'induction, on porte le pourcentage de "petites colonies" par rapport aux survivants, corrigé pour le pourcentage de mutants spontanés (de 1 à 10 %) en fonction du temps d'incubation à 52°C.

On constate sur la figure 16V que la courbe d'induction présente une 1ère partie ascendante, elle atteint un maximum entre 10 minutes et 20 minutes de traitement et ensuite décroît rapidement.

Cette décroissance pour des temps de chauffages prolongés s'explique par la thermosensibilité accrue présentée par les mutants déficients respiratoires par rapport aux cellules normales. Cet accroissement de la sensibilité a été décrit par d'autres auteurs (95 - 98 - 25) et nous l'avons nous-mêmes confirmée.

C'est d'ailleurs à partir de cette donnée que l'on peut conclure en faveur d'une induction et non d'une sélection par le chauffage de mutants respiratoires pré-existants dans la population.

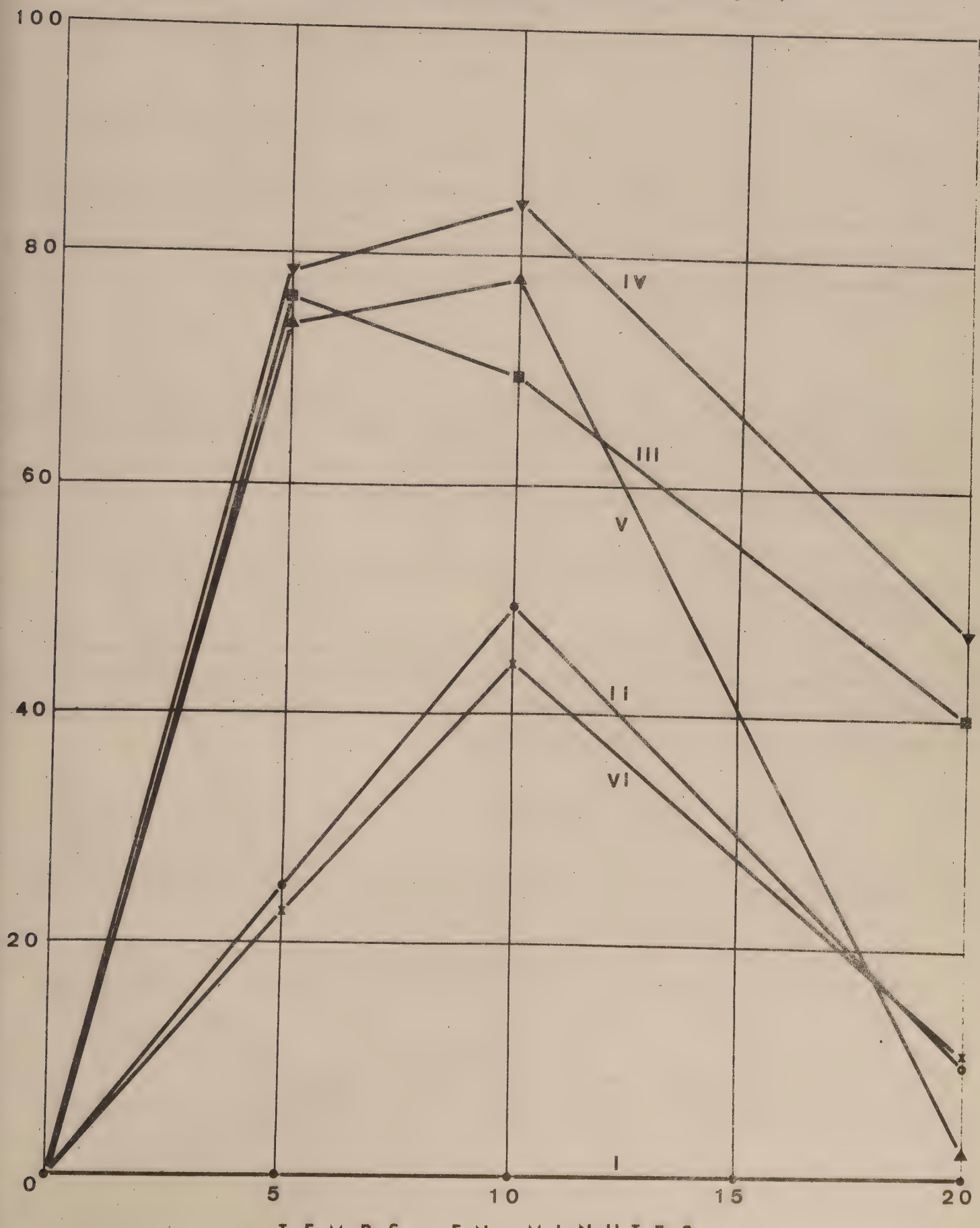
On constate que quand on traite des populations non synchrones, même si les cultures sont en phase exponentielle de croissance et qu'elles ont atteint la même concentration cellulaire, la maximum de mutants "petite colonie" induits fluctue considérablement d'une expérience à l'autre.

Ces fluctuations ont par la suite pu être expliquées, grâce aux expériences de synchronisation.

b) Sensibilité à l'effet mutagène cytoplasmique au cours du cycle cellulaire : Sur des cultures en croissance synchronisée, les variations du pourcentage de "petites colonies" induites par la température de 52°C ont été déterminées.

On trouve que l'effet mutagène cytoplasmique de la température supra-optimale varie au cours du cycle cellulaire (fig. 9). Sur celle-ci on voit l'évolution de la dose mutagène 20 % (la "dose" représente la durée de séjour à 52°C en minutes) au cours du cycle cellulaire en même temps que l'évolution de la dose létale 10 %. Les valeurs de la dose mutagène 20 % ont été déterminées à l'aide des résultats portés sur la figure 16 qui présente les courbes d'induction à 52°C de mutants "petites colonies" à différents moments du cycle cellulaire.

Fig. 16 : Mutagenèse cytoplasmique : induction de "petites colonies" en fonction du temps de chauffage à 52°C à différents moments du cycle cellulaire ; I à VI se réfèrent aux stades de la croissance synchronisée auxquels les cellules ont été soumises à 52°C (voir fig. 9).



On constate que l'amplitude de la variation de thermosensibilité au cours du cycle cellulaire est ici beaucoup plus importante que pour l'effet létal. C'est aussi lors du bourgeonnement que se présente la plus grande sensibilité à l'effet mutagène cytoplasmique.

Les maxima de sensibilité aux deux effets coïncident approximativement. Il est donc possible qu'une même cible soit en cause.

c) Réparation des lésions mutagènes : L'induction de mutants cytoplasmiques "petite colonie" par l'incubation à 52°C est aussi réparable.

Le maximum de réparation est observé quand les cellules aérées sont conservées pendant environ 3 jours dans un milieu en absence de division (eau bidistillée à 28°C) avant d'être étalées sur un milieu où elles se divisent. Dans ce cas, la réparation est souvent totale.

Les résultats pour l'induction immédiate et l'induction différée sont présentés sur la figure 18. On constate que la cinétique de cette réparation est complexe (fig. 17). Les lésions mutagènes sont réparées beaucoup plus rapidement que les lésions létales.

c1) Effet du froid sur la réparation des lésions mutagènes cytoplasmiques : Le protocole expérimental est celui déjà décrit pour la réparation de l'effet létal.

La figure 18 montre les courbes d'induction de mutants cytoplasmiques "petite colonie", à la suite d'étalements immédiats, différés à 28°C et différés à 4°C. On constate que l'incubation à 4°C empêche la réparation des lésions mutagènes du chauffage à 52°C.

c2) Effet de la cycloheximide : On constate sur la figure 19 e,f que si la cycloheximide à 1 µg/ml est présente dans le milieu de conservation pour l'étalement différé, il y a une inhibition de la réparation des lésions mutagènes. Autrement dit, une synthèse protéique d'origine nucléaire est nécessaire à la réparation de l'effet thermique.

La figure 19 montre que pour que cette réparation soit inhibée, il faut que la cycloheximide soit présente dans le milieu de conservation

Fig. 17 : Cinétique de réparation des lésions mutagènes cytoplasmiques induites par différents temps de traitement à 52°C d'une culture de la souche N 123 en croissance exponentielle. Des étalements sont faits au cours du temps de conservation en eau bidistillée à 28°C avec aération après traitement à 52°C

- a - cellules portées 5 minutes à 52°C
- b - cellules portées 20 minutes à 52°C
- c - cellules portées 40 minutes à 52°C

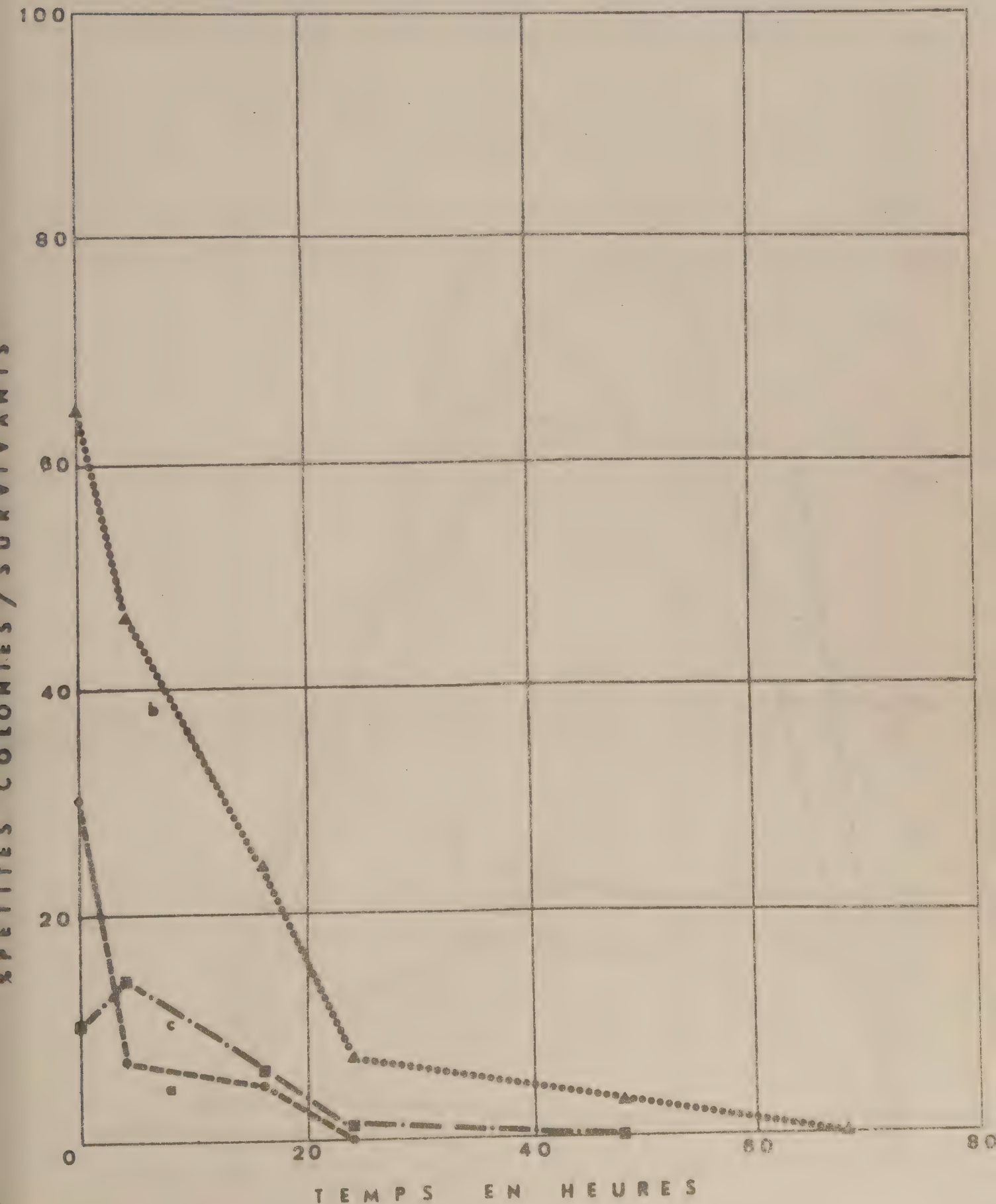


Fig. 18 : Influence de la température de post-incubation sur la réparation des thermolésions mutagènes cytoplasmiques : une culture de la souche N 123 traitée à 52°C en croissance exponentielle est étalée sur YEP: (—) immédiatement ; (---) après 5 jours de conservation en eau bidistillée à 28°C avec aération ; (—•—) après 5 jours de conservation en eau bidistillée à 4°C avec aération. Les survies correspondantes sont sur la figure 13.

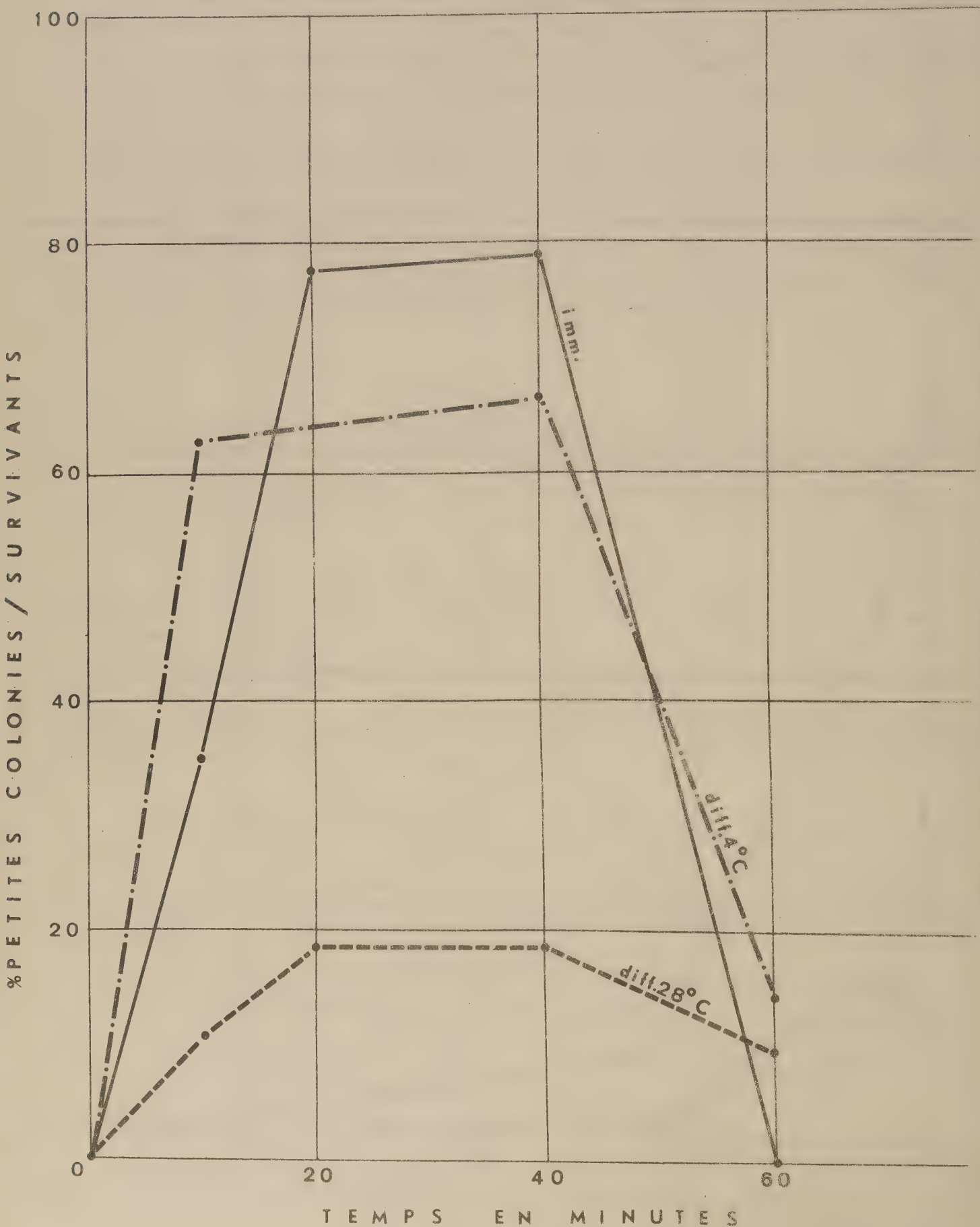
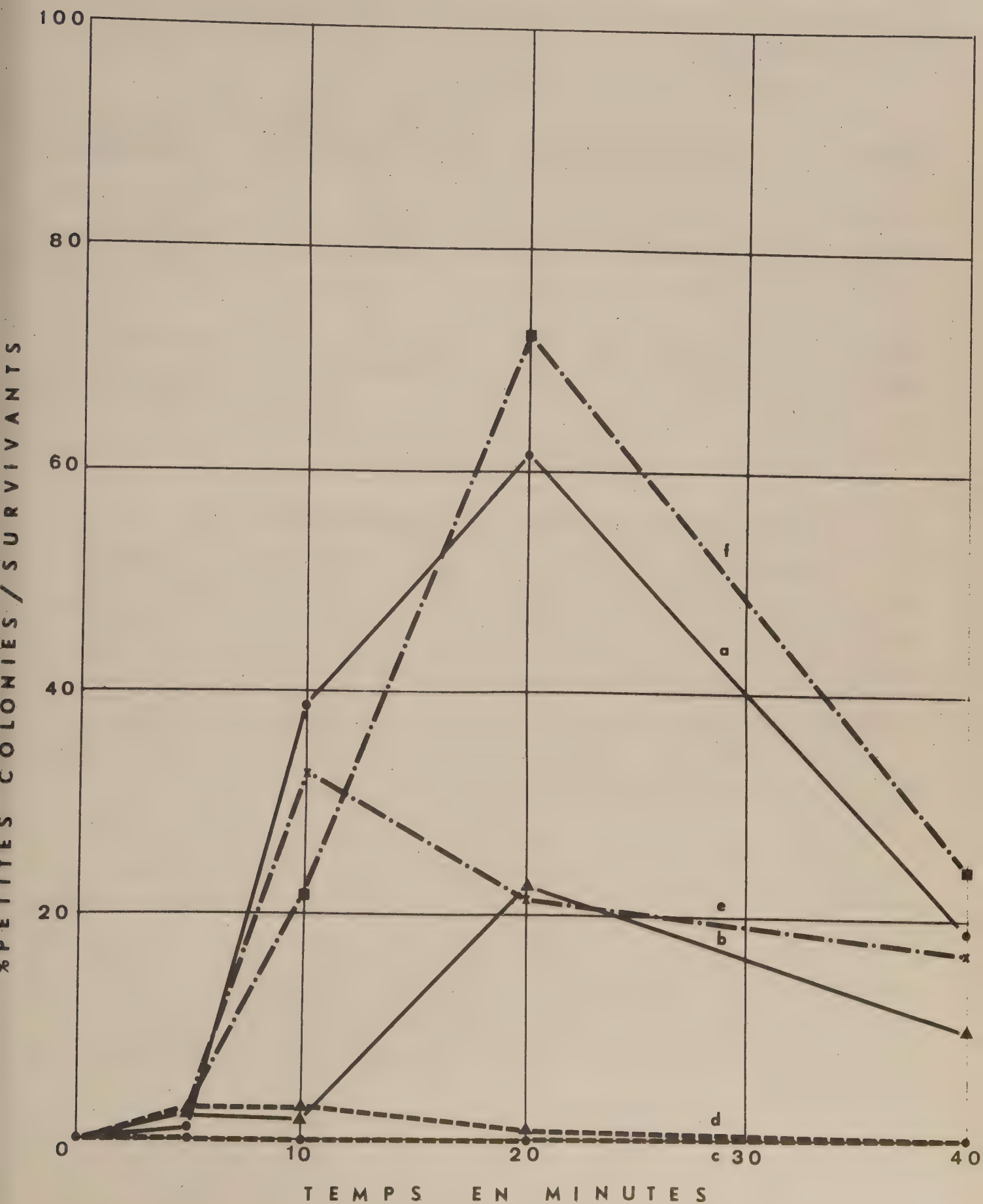


Fig. 19 : Influence de la cycloheximide sur la réparation des lésions mutagènes cytoplasmiques du traitement à 52°C : les cellules (souche N 123) traitées à 52°C en phase de croissance exponentielle sont étalées sur YEP: pour les symboles, voir le tableau n° 2 dans le texte. Les survies correspondantes sont sur la figure 14.



et le blocage est encore plus marqué si les cellules ont été pré-traitées à la cycloheximide.

Le tableau 2 résume ces résultats :

<u>Culture</u>	<u>Induction immédiate</u>	<u>Traitement durant le maintien en milieu liquide</u>	<u>Induction différée</u>
sans CH	normale (a)	sans CH	réparation (c)
sans CH	normale (a)	avec CH	inhibition partielle de la réparation (e)
avec CH	diminuée (b)	sans CH	réparation (d)
avec CH	diminuée (b)	avec CH	inhibition marquée de la réparation (f)

2 - Effet mutagène nucléaire de la température de 52°C

L'élévation de la température provoque la mutation cytoplasmique "petite colonie" ; l'ADN mitochondrial est donc finalement altéré. Ceci pourrait être l'aboutissement d'une chaîne de réactions impliquant dans l'effet primaire de la température de 52°C l'atteinte de protéines qui régulent la synthèse de l'ADN mitochondrial, ou une altération dans la ségrégation des mitochondries de la cellule-mère vers la cellule-fille.

Nous avons donc examiné l'action d'une température supra-optimale sur les mutations nucléaires. Si, dans ce cas, l'induction existait, l'implication de l'ADN dans les effets thermiques serait plus probante.

Chez les bactéries, l'induction à des fréquences élevées de plusieurs classes de mutants par action thermique a été décrite (128-129). Les températures utilisées et les temps de contact sont cependant beaucoup plus élevés que dans nos conditions.

Nous avons examiné l'effet de l'incubation à 52°C sur les réversions vers la prototrophie chez une souche histidine-déficiente (hi_1^-). Dans ce cas et jusqu'à 80 minutes, de traitement à 52°C d'une culture en croissance exponentielle, il n'y a pas d'augmentation dans la fréquence des révertants.

Chez *Escherichia coli* également aucune réversion n'est décrite parmi les mutations induites, nous sommes alors passés à l'étude de l'action de 52°C sur les mutations "aller".

Nous avons choisi la mutation de la sensibilité à la canavanine (can^S) vers la résistance à cet antibiotique (can^R). On sait que la résistance à la canavanine est due à une mutation nucléaire récessive affectant la biosynthèse de l'arginine perméase (117-29).

Nous sommes donc partis d'une souche sauvage haploïde can^S (fréquence spontanée de cellules can^R de l'ordre de 10^{-5}) et nous avons examiné la fréquence de mutants can^R au cours de l'incubation de cette souche à 52°C.

La canavanine est un analogue de l'arginine. Nous avons donc travaillé sur une souche prototrophe pour l'arginine et pour éviter des phénomènes de compétition pour l'incorporation de la canavanine par les cellules, nous avons utilisé du milieu minimum additionné ou non de canavanine (concentration finale utilisée de 60 $\mu\text{g/ml}$).

a) Influence de la phase de croissance : Pour des cultures traitées à 52°C en phase de croissance exponentielle, nous avons trouvé une augmentation de la fréquence de tels mutants (fig. 20a). La courbe d'induction des mutants est obtenue en portant le rapport mutants/survivants, corrigé pour la fréquence de mutants spontanés, en fonction du temps d'incubation à 52°C. On constate sur la figure 20a que, la courbe d'induction atteint un maximum et présente ensuite une décroissance.

Les courbes de survie correspondantes, sur milieu minimum et sur milieu complet sont présentées sur la figure 20b.

Les courbes d'induction de mutants cytoplasmiques "petite colonie" correspondantes sont sur la figure 20c.

La possibilité d'une sélection de mutants can^R , génétiquement thermorésistants, initialement présents dans la population a été écartée par des expériences de reconstruction. En effet, les souches can^S ou can^R et le mélange à parts égales de ces deux souches présentent la même thermosensibilité. Il convient aussi de faire remarquer que les mutants résistants à la canavanine induits ne sont pas des déficients respiratoires.

Les cellules traitées en phase de croissance stationnaire sont nettement moins sensibles à l'effet mutagène nucléaire, ainsi que nous

Fig. 20a : Induction de mutants can^r par le traitement à 52°C d'une souche sauvage haploïde (N 123) en phase de croissance exponentielle. Réparation des lésions mutagènes : les cellules, après l'incubation à 52°C , sont étalées sur MM : (●) immédiatement ; (▲) après 5 jours en eau bidistillée à 28°C avec aération.

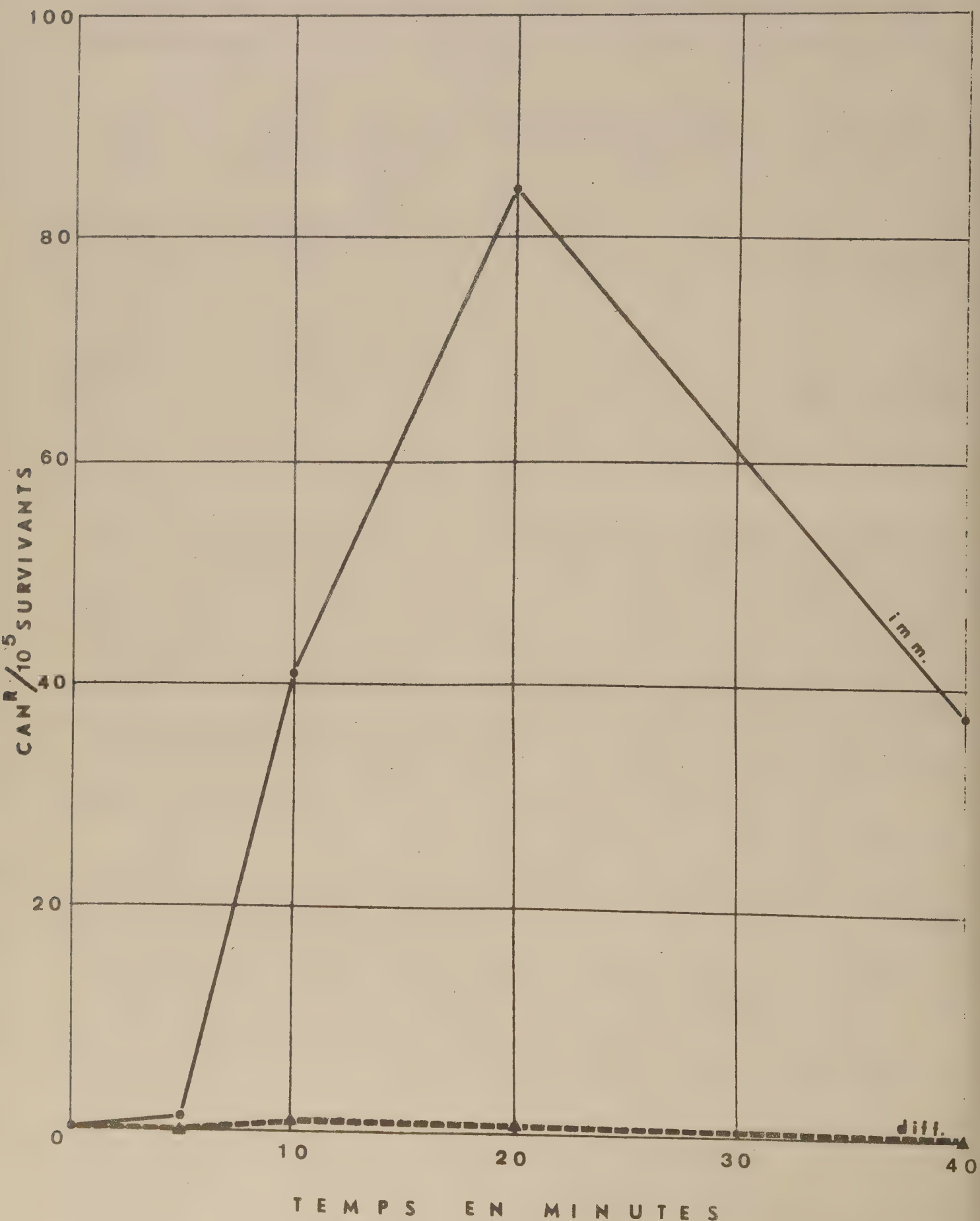


Fig. 20b : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C (correspondante à la fig. 20a). Les cellules chauffées en croissance exponentielle sont étalées : (▲) immédiatement sur YEP ; (●) immédiatement sur MM ; (■) sur MM, après 5 jours de conservation en eau bidistillée à 28°C avec aération.

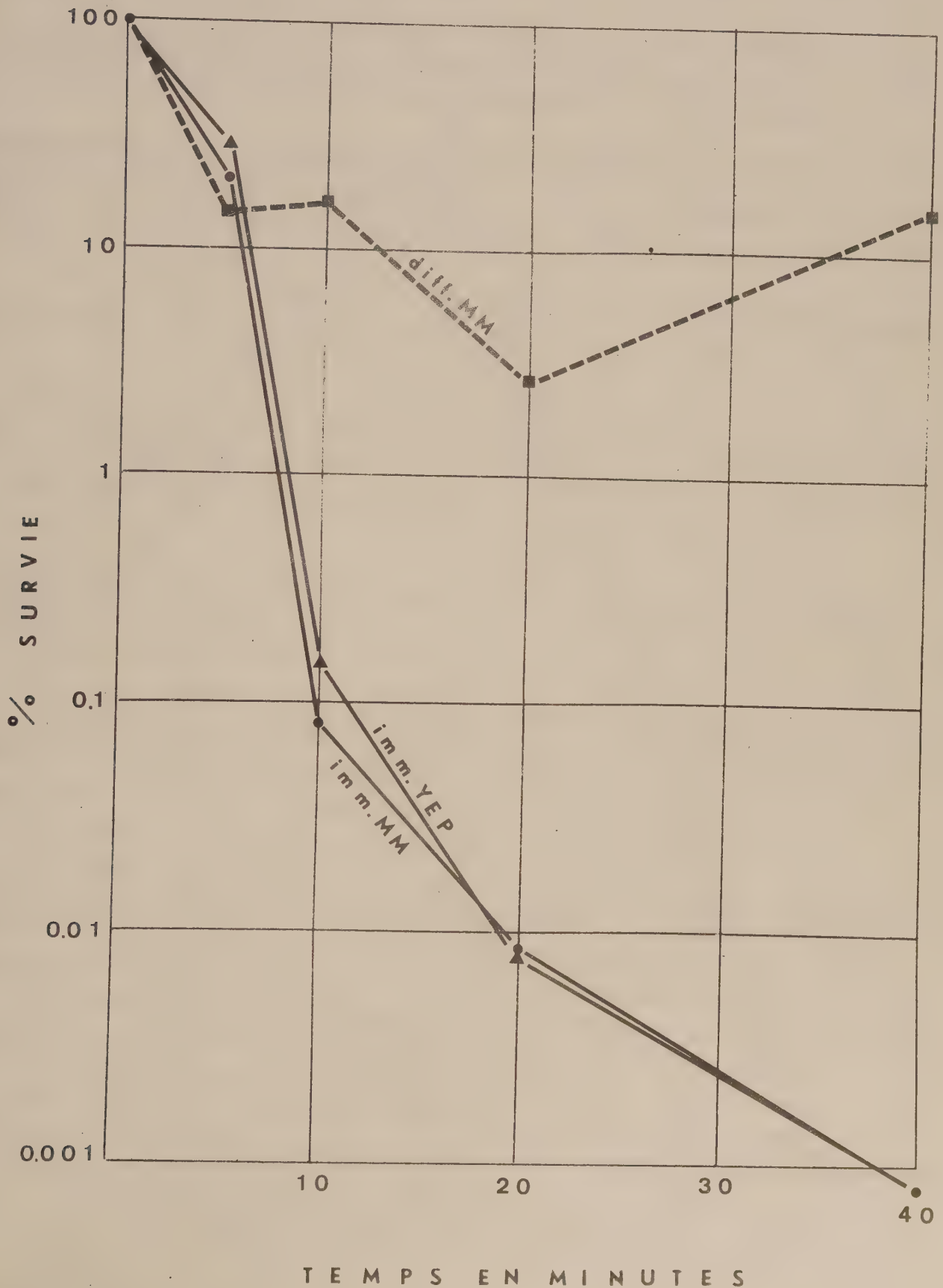
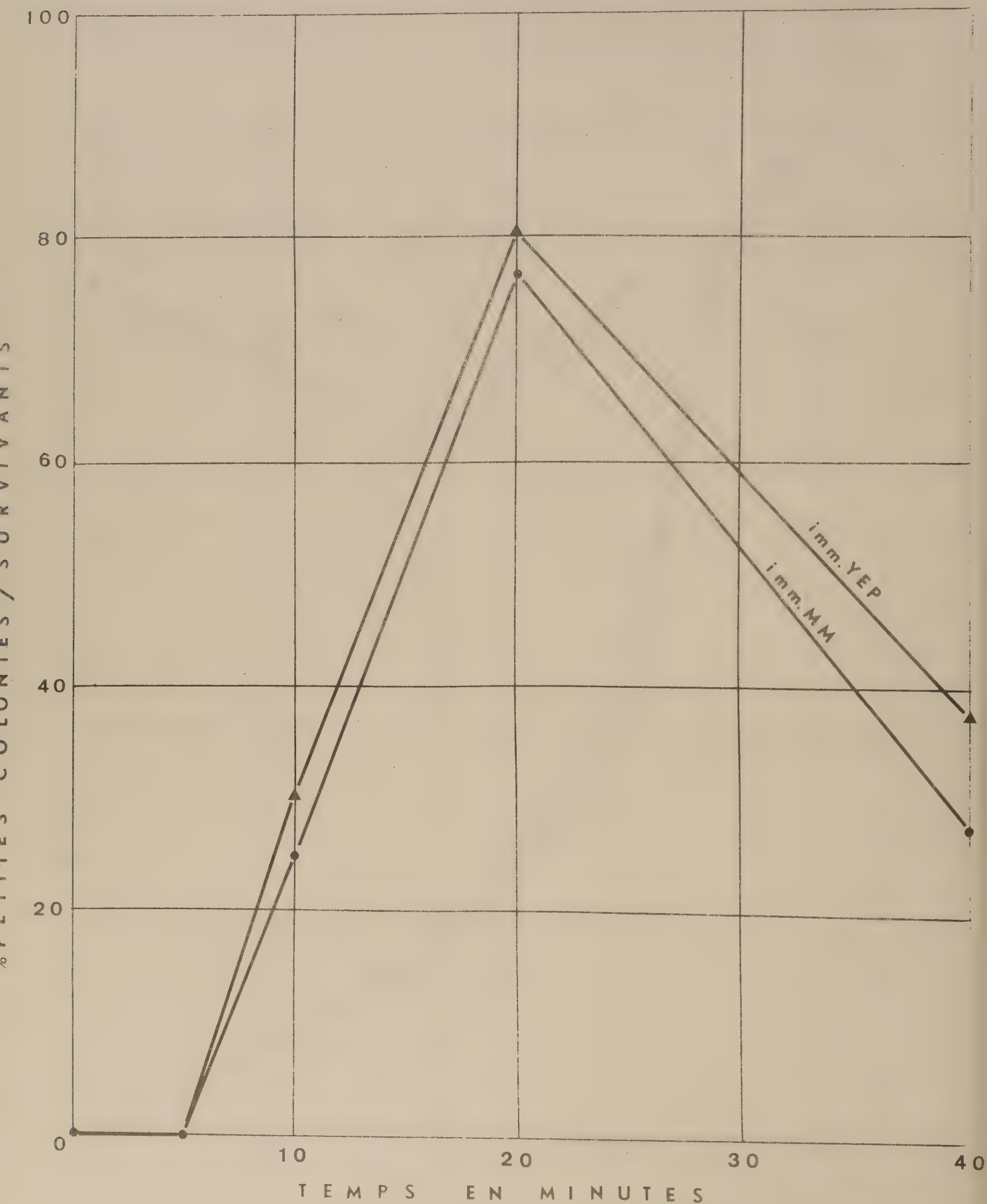


Fig. 20c : Induction de "petites colonies" par le traitement à 52°C (correspondante à la fig. 20a). Les cellules chauffées en croissance exponentielle sont ensuite étalées : (▲) immédiatement sur YEP ; (●) immédiatement sur MM.



l'avons déjà montré pour l'effet létal et mutagène cytoplasmique. La courbe d'induction de mutants canavanine-résistants dans ces conditions est présentée sur la figure 21.

Il se peut que le chauffage brutal que Zamenhof (128-129) a dû infliger à *Escherichia coli* pour l'obtention de mutants s'explique par le fait qu'il a utilisé des cultures en phase stationnaire de croissance.

b) Réparation des lésions mutagènes : Les lésions mutagènes vers la résistance à la canavanine sont réparables. Les conditions requises pour une complète réparation sont les mêmes que celles déjà décrites pour la réparation de l'effet létal.

Sur les figures 20a et 21 sont présentées les courbes d'induction de ces mutants à 52°C après étalement immédiat ou différé.

Puisqu'il y a une induction de mutants nucléaires par l'incubation à 52°C, nous concluons que l'ADN est touché directement ou indirectement par cette température supra-optimale.

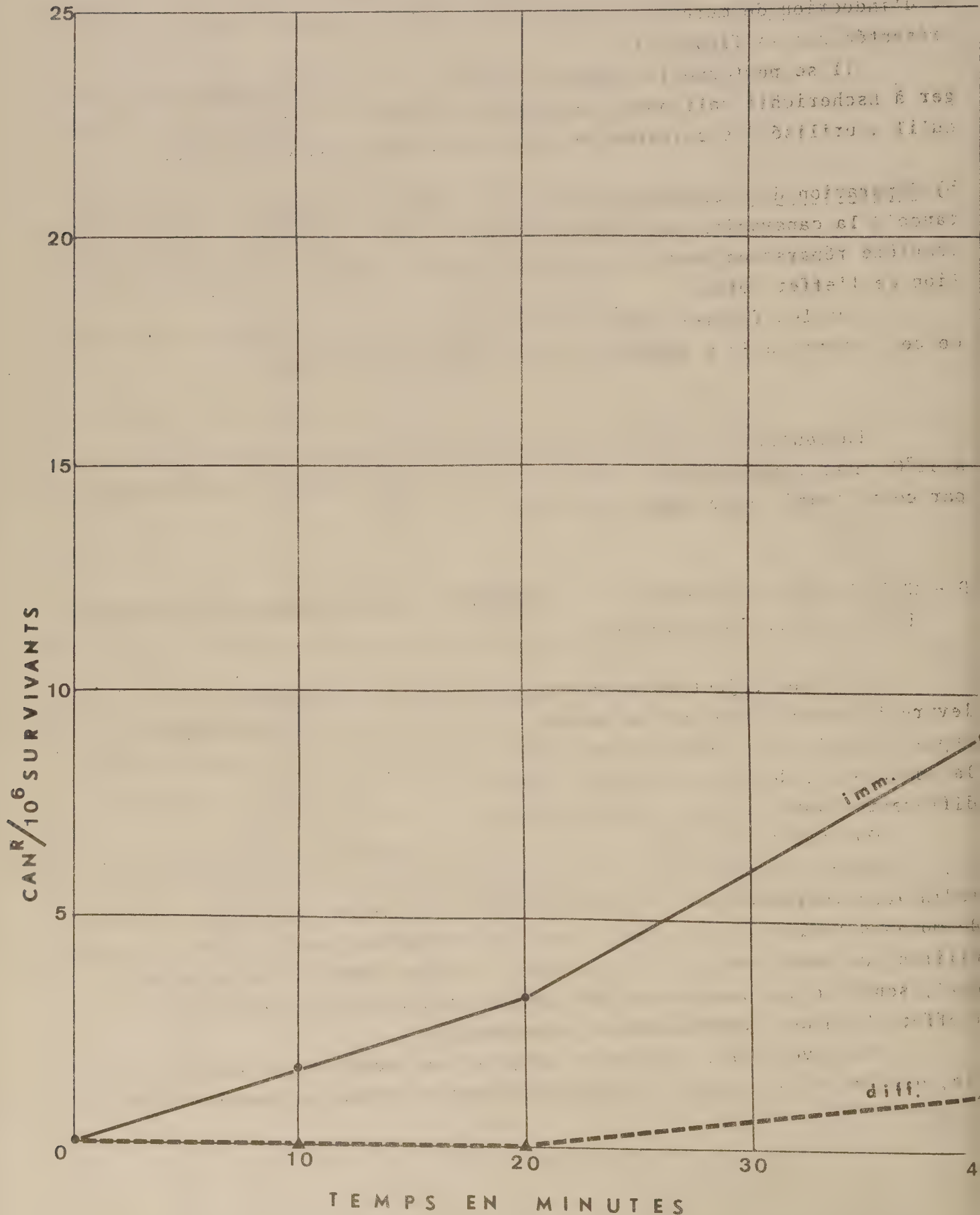
D - COMPARAISON DES EFFETS DE LA TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE SUR DIFFERENTS MUTANTS DE RADIOSENSIBILITE

L'un des objectifs de ce travail consistait à comparer chez la levure la sensibilité aux radiations et la sensibilité à une température supra-optimale. Une série d'expériences comparatives de la sensibilité à la température de 52°C de souches haploïdes de *Saccharomyces cerevisiae*, différentes quant à leur radiosensibilité, a été entreprise.

On rappelle que chez *Escherichia coli*, Bridges et coll. (9) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre la sensibilité aux radiations ionisantes et la thermosensibilité. Ils ont étudié une dizaine de mutants radiosensibles (*Rec⁻*, *Lon⁻*) et trouvé un parallélisme des sensibilités aux deux agents. Plus récemment, ils ont constaté qu'un mutant *Exr⁻*, sensible aux radiations ionisantes, ne l'est pas vis-à-vis de l'effet thermique (communication personnelle).

Nous avons pris soin de ne comparer des souches que de même ploïdie, de même signe sexuel, et normales quant au phénotype respiratoire. Il

Fig. 21 : Induction de mutants can^r par le traitement à 52°C d'une souche sauvage haploïde (N 123) en phase de croissance stationnaire. Réparation des lésions mutagènes : les cellules après l'incubation à 52°C sont étalées sur MM : (●) immédiatement ; (▲) après 5 jours en eau bidistillée à 28°C avec aération.



est, en effet, connu que ces facteurs interfèrent avec la radiosensibilité (46-45-58), et, en ce qui concerne le degré de ploïdie et le phénotype respiratoire, avec la thermosensibilité également (124-95). On a comparé la survie à 52°C de cultures non synchrones en croissance exponentielle du type sauvage et du type mutant, issues d'un inoculum semblable et ayant atteint la même concentration cellulaire.

1 - Mutants sensibles aux rayons ultraviolets (UV)

Nous avons étudié comparativement la survie à 52°C d'un mutant UV sensible et du type sauvage dont il dérive. Les deux souches suivantes ont été utilisées : N 123, de type sauvage haploïde et le mutant UV sensible, N 123-UVS₂ (rad₁), qui en dérive (60). Ce mutant appartient au groupe IV de la classification de Parry et Parry, basée sur l'effet de photorestauration durant le "liquid holding recovery" (69), c'est-à-dire qu'il est apparemment incapable d'exciser les dimères de pyrimidines formés par les rayons UV dans l'ADN nucléaire (42).

On constate qu'il n'y a pas de différence de thermosensibilité entre le type sauvage et le mutant UV sensible (fig. 22). On voit aussi que le niveau de réparation atteint, selon les courbes de survie différée, est du même ordre pour les deux souches.

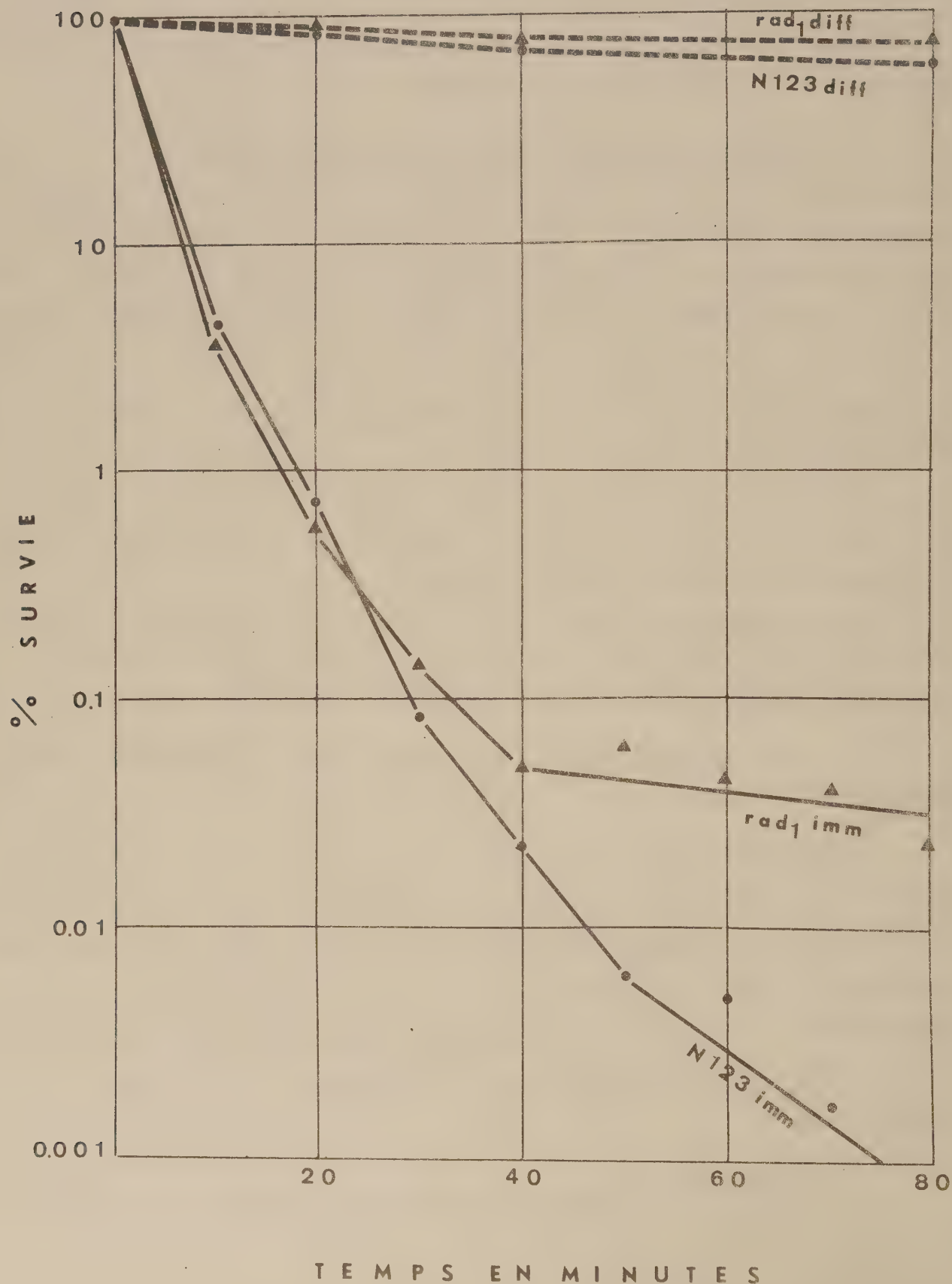
Chez *Escherichia coli*, la corrélation entre la sensibilité aux rayons UV et la sensibilité à la température supra-optimale, en ce qui concerne les mutants Hcr⁻, n'existe également pas (9).

2 - Mutants sensibles à la fois aux rayons ultraviolets et aux radiations ionisantes

Nous sommes passés à l'étude d'une nouvelle paire de souches : 2 spores issus du croisement de N 123 par rad₆ de Cox (14) : 5d, souche de type sauvage haploïde, 5c, souche de type mutant, UV et γ sensible (rad₆).

Ce mutant, d'après la classification de Parry et Parry (69) est comparable au type sauvage (groupe I). Il serait plus sensible par un blocage dans une étape postérieure à l'étape d'excision de la radiolésion ; la déficience porterait soit dans la synthèse de réparation, soit dans la soudure des ruptures, ou encore dans la coordination de l'ensemble de ces enzymes (69).

Fig. 22 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et UV sensible traitées en phase exponentielle de croissance. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (N 123) ; (▲) mutant rad_1 (N 123- uvr_z). Les courbes en pointillé représentent l'étalement différé.



La souche de type sauvage aussi bien que le mutant se sont montrés extrêmement sensibles à l'effet létal de 52°C et nous avons comparé leurs survies à 45°C également.

Il est intéressant de remarquer sur les figures 23 et 24 que l'inactivation pour une même souche, à 45°C, présente un épaulement, suivi d'une partie linéaire, tandis qu'à 52°C, l'épaulement tend à disparaître. Sur ces figures, on constate qu'à aucune de ces deux températures d'inactivation, il n'y a de différence de thermosensibilité entre les deux souches. Leur capacité de réparer les thermolésions est aussi du même ordre de grandeur.

Nous avons étudié également une autre paire de souches : X1687-101B souche de type sauvage haploïde et KC372, souche de type mutant, sensible aux rayons UV et aux radiations ionisantes (rad_{18}). Cette souche a été dérivée de X1687-101B par Resnick (83) et n'est pas allélique de rad_6 (23).

Sur la figure 25 nous voyons que le mutant n'est pas plus sensible à l'effet létal de 52°C que le type sauvage ; c'est plutôt le contraire qui s'observe.

Nous avons toujours réalisé parallèlement à la survie à 52°C, les survies aux UV (dans le cas des mutants UV sensibles) et les survies aux UV et aux rayons gamma du ^{60}Co (dans le cas des mutants UV et X sensibles), de façon à pouvoir comparer leur thermosensibilité et leur radiosensibilité dans les mêmes conditions physiologiques.

3 - Effet de la caféine sur la réparation des thermolésions

La caféine est un inhibiteur connu de la réparation enzymatique des lésions provoquées par le rayonnement ultraviolet en particulier. Ceci a été démontré chez le bactériophage (90), chez les bactéries (98), chez la levure (61). La caféine semble inhiber à la fois le système de réparation par excision-resynthèse et celui de réparation par recombinaison (post-replication repair (121)). Son mode d'action est complexe et encore discuté (30).

Nous avons examiné l'action de cette purine méthylée sur la réparation des lésions provoquées par l'incubation à la température supra-optimale. Nous avons commencé par étudier l'action de la caféine sur une souche sauvage haploïde.

Fig. 23 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et UV et X-sensible traitées en phase exponentielle. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (5d) ; (▲) mutant rad_6 (5c). Les courbes en pointillé représentent l'étalement différé. Le niveau de la cassure est variable d'une expérience à l'autre, et, par exemple, il est arrivé que les 2èmes parties des courbes soient en position inversée.

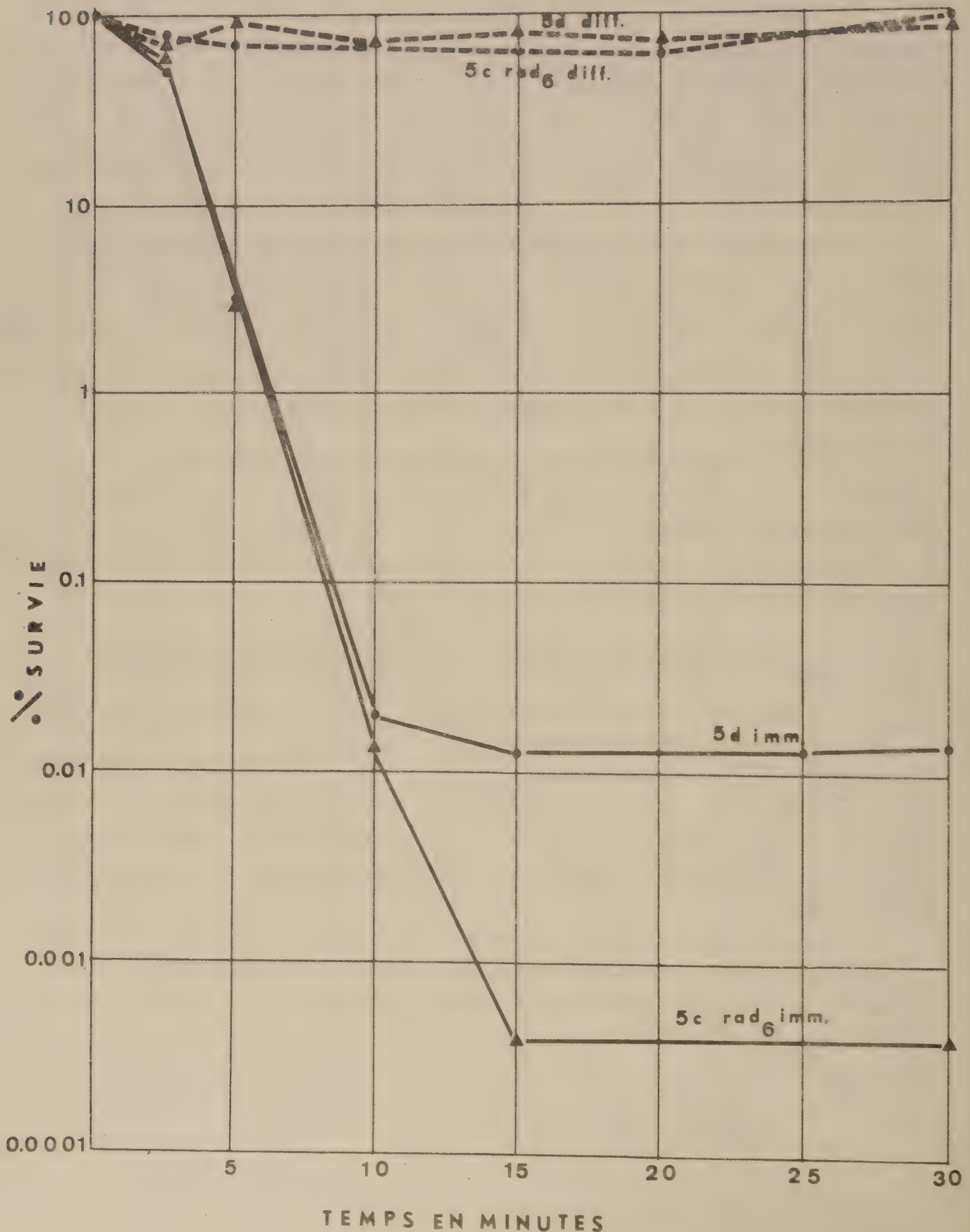


Fig. 24 : Survie en fonction du temps d'incubation à 45°C d'une souche sauvage et d'un mutant UV et X-sensible (haploïdes) traités en phase exponentielle de croissance. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (5d) ; (▲) mutant rad_6 (5c). Les courbes en pointillé représentent l'étalement différé.

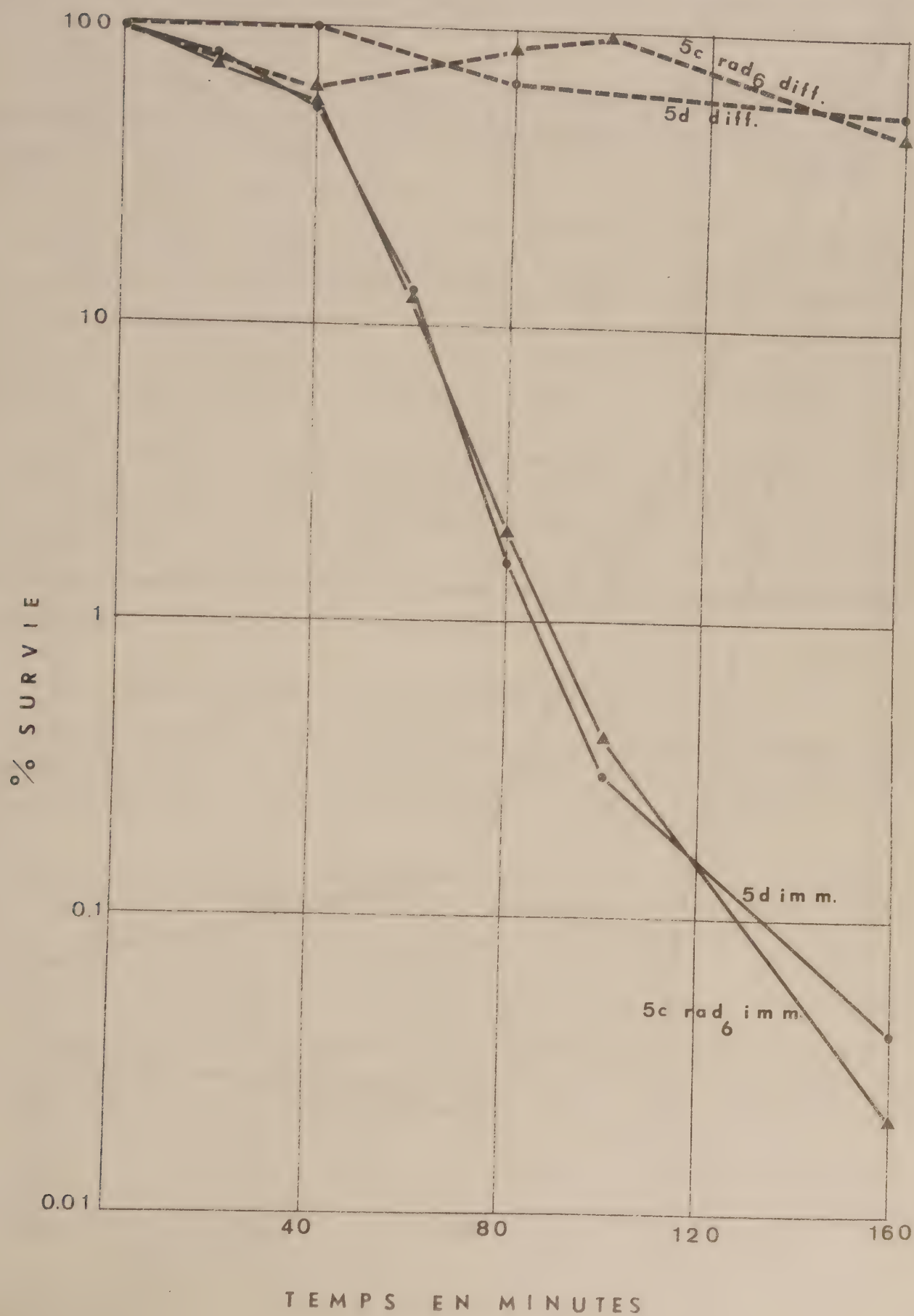
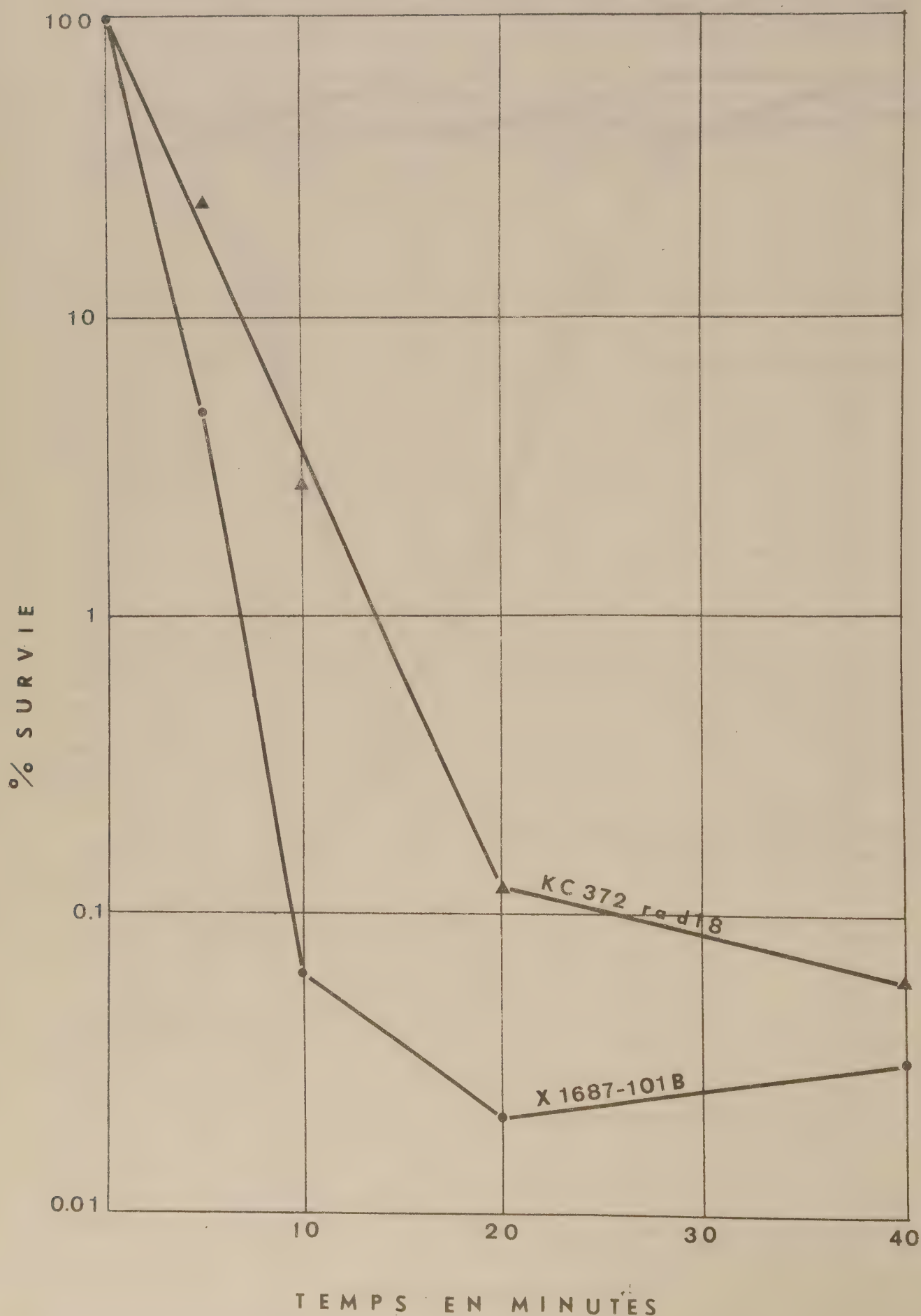


Fig. 25 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C d'une souche sauvage et d'un mutant UV et X-sensible (haploïdes) traités en phase exponentielle de croissance : (●) type sauvage (X1687-101B) ; (▲) mutant dérivé rad₁₈ (KC372).



Des cellules en croissance exponentielle sont traitées à 52°C et étalées immédiatement, d'une part sur milieu complet solide, d'autre part sur milieu complet additionné de caféine à une concentration finale de 1,2 mg/ml.

Pour chaque temps de chauffage, des aliquotes de la culture sont prélevées, lavées deux fois en eau bidistillée et conditionnées pour l'étalement différé, d'une part dans une solution de caféine à 1,2 mg/ml, et d'autre part dans l'eau bidistillée.

Ces différentes préparations sont incubées à 28°C avec aération. Au bout de 5 jours dans ces conditions, on procède à l'étalement sur du milieu complet solide additionné ou non de caféine à une concentration finale de 1,2 mg/ml. On constate qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur de la caféine, ni sur la réparation des lésions létales, ni sur celle des lésions mutagènes cytoplasmiques produites par l'incubation à 52°C (figures 26 et 27).

Les résultats obtenus avec la caféine sont cohérents avec l'absence de corrélation entre la thermosensibilité et la radiosensibilité.

L'absence de thermosensibilisation des mutants UV sensibles ainsi que l'absence d'effet de la caféine sur la réparation des thermolésions conduisent à penser que les effets des rayons UV sont indépendants de ceux provoqués par l'élévation de la température.

4 - Mutants sensibles aux radiations ionisantes

Pour compléter l'étude des mutants de radiosensibilité, nous avons comparé la survie à 52°C de différents mutants spécifiquement sensibles aux radiations ionisantes à celle de souches de type sauvage.

a) 1ère classe de souches : Mutants radiosensibles isolés par Snow (105) :

Les souches utilisées sont les suivantes :

- N 123, souche de type sauvage haploïde
- S1437-11b, souche radiosensible (rs₄) haploïde
- S1448-3d, souche radiosensible (rs₁₃) haploïde

Nous avons établi comparativement pour ces souches la survie à 52°C en phase de croissance logarithmique. Sur la figure 28 sont présentées les courbes de survie immédiates et différées.

Fig. 26 : Effet de la caféine sur la réparation des thermolésions létales: cellules sauvages haploïdes (N 123) traitées à 52°C en croissance exponentielle et étalées

- a - immédiatement sur YEP
- b - immédiatement sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml
- c - étalement différé sur YEP, après 5 jours en eau
- d - étalement différé sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml, après 5 jours en eau
- e - étalement différé sur YEP, après 5 jours en caféine à 1,2 mg/ml
- f - (coïncidence avec e) étalement différé sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml, après 5 jours en caféine à 1,2 mg/ml

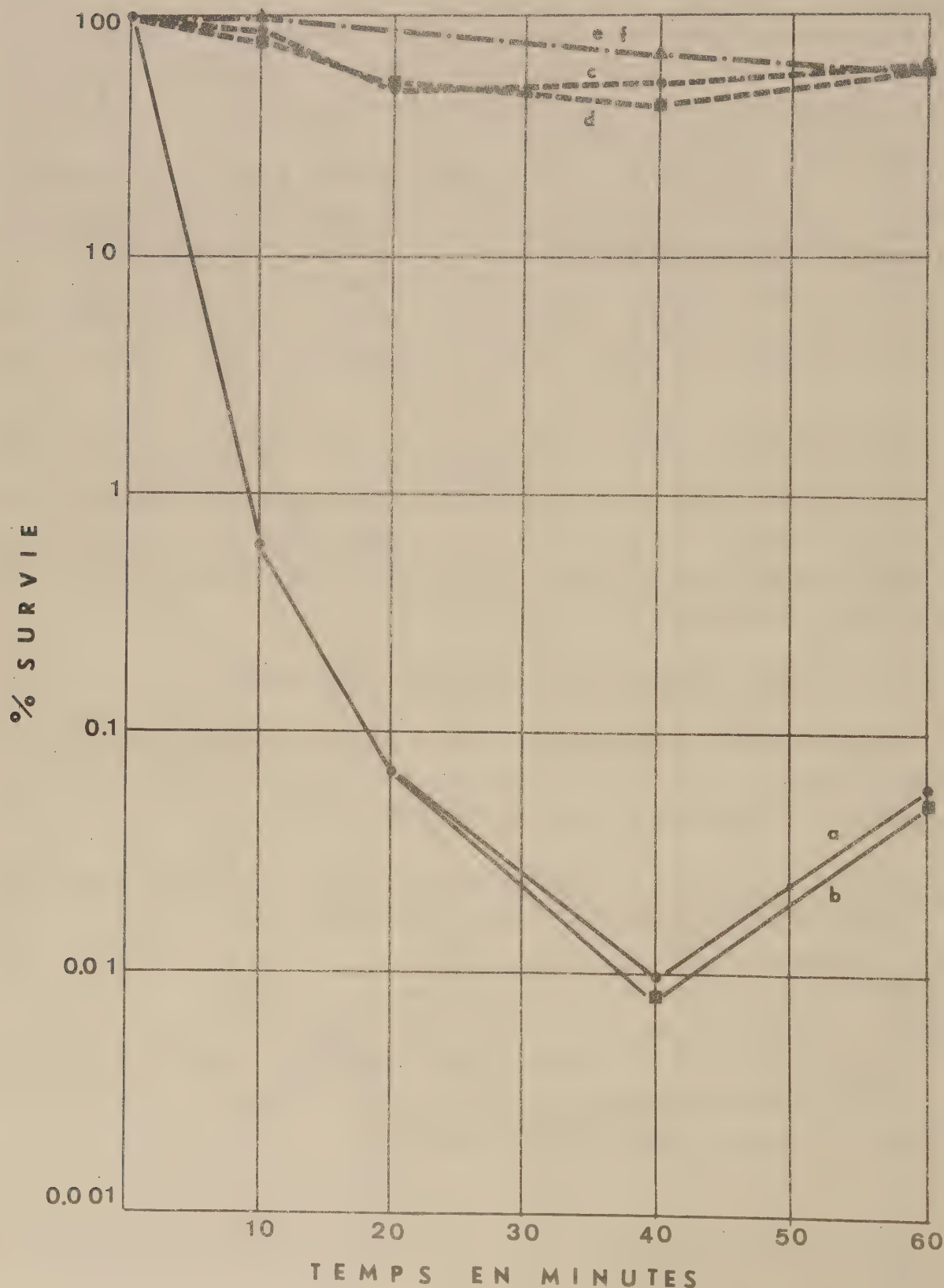


Fig. 27 : Effet de la caféine sur la réparation des thermolésions mutagènes cytoplasmiques : les survies correspondantes sont sur la fig. 26.

- a - étalement immédiat sur YEP
- b - étalement immédiat sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml
- c - étalement différé sur YEP, après 5 jours en eau
- d - étalement différé sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml, Après 5 jours en eau
- e - étalement différé sur YEP, après 5 jours en caféine à 1,2 mg/ml
- f - étalement sur YEP + caféine à 1,2 mg/ml, après 5 jours en caféine 1,2 mg/ml

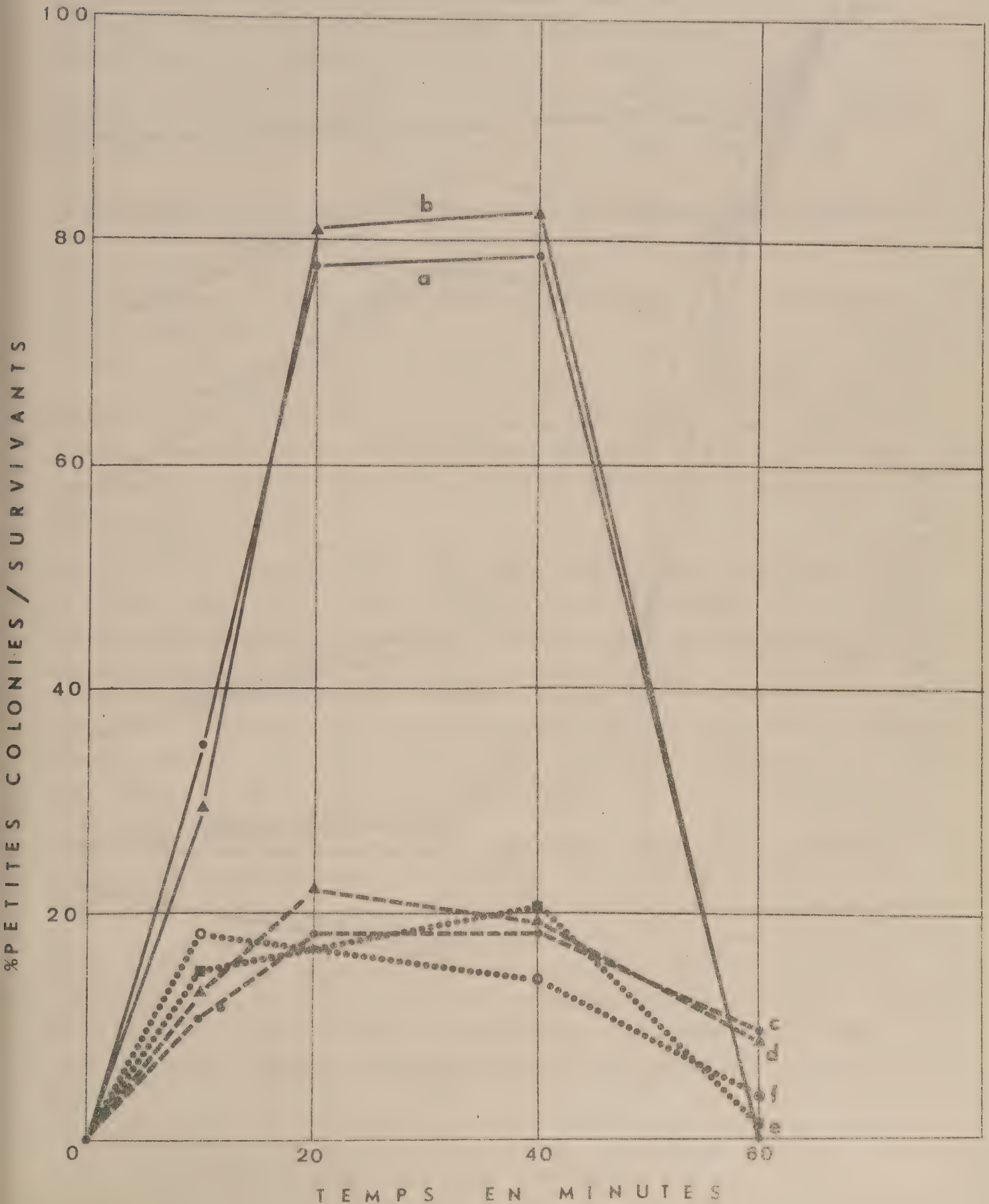
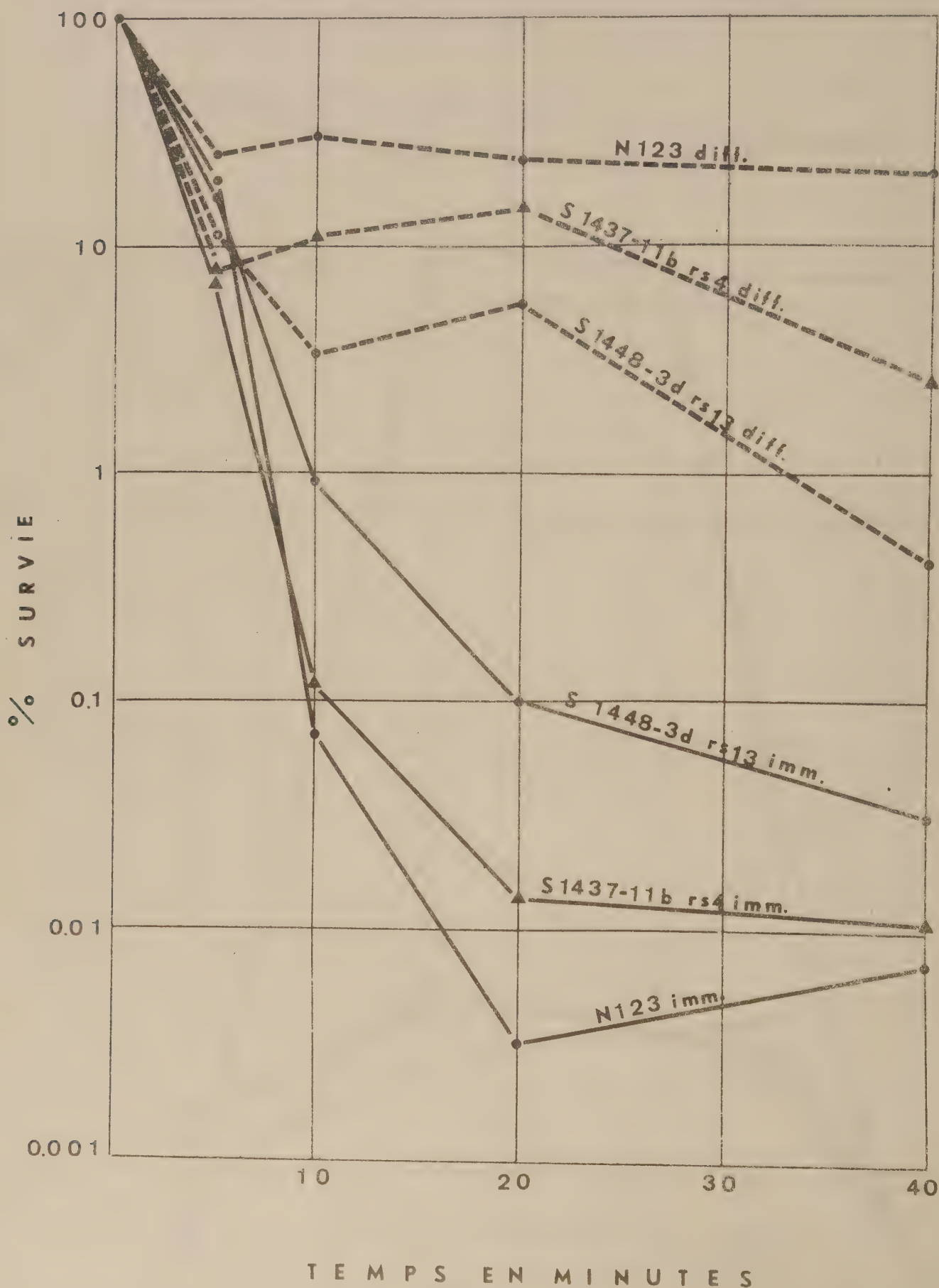


Fig. 28 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et X-sensibles traitées en phase de croissance exponentielle. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (N 123) ; (▲) mutant X-sensible rs4 (S1437-11b) ; (○) mutant X-sensible rs13 (S1448-3d). Les courbes de survie en pointillé représentent l'étalement différé.



Ces mêmes cultures parvenues en phase stationnaire ont été traitées aux rayons gamma du ^{60}Co (fig. 29).

En comparant ces deux figures, on constate qu'il n'y a pas de corrélation entre la thermosensibilité et la radiosensibilité.

On observe cependant sur la figure 28, en comparant les survies différées des différentes souches, que les mutants radiosensibles réparent moins efficacement les thermolésions que la souche de type sauvage.

b) 2ème classe de souches : Mutants radiosensibles isolés par Resnick (83)

Nous avons comparé les souches suivantes :

- X1687-101B, souche de type sauvage haploïde
- KC376, souche de type mutant haploïde, radiosensible (xs_1) dérivée de X1687-101B
- KC383, souche radiosensible (xs_{2-2}) haploïde, dérivée de X1687-101B.

Ces mutants, un an après leur isolement, avaient perdu leur caractère de radiosensibilité. Nous avons quand même comparé leur thermosensibilité par rapport au type sauvage d'origine car il y a des indications que d'autres anomalies, liées à la mutation xs persistent (Laskowski, communication personnelle).

Selon les travaux de von Borstel et coll., (114) quelques uns des gènes qui contrôlent la radiosensibilité sont des gènes mutateurs. C'est le cas des gènes xs_{1-1} et rad_{18} qui entraînent une augmentation de 5 à 7 fois du taux de mutation spontanée (addition-délétion) et également du gène xs_3 qui provoque une augmentation de 2 fois de ce taux (addition-délétion et substitution de bases). Nous avons, en effet, eu beaucoup de difficultés avec les souches porteuses de ces mutations. Elles se sont révélées extrêmement instables tant du point de vue de la capacité respiratoire que du signe sexuel. D'autre part, leur thermosensibilité est très variable d'une expérience à l'autre.

Les résultats obtenus pour l'étalement immédiat et l'étalement différé des souches sauvage, xs_1 et xs_3 , à la suite de l'incubation à 52°C , sont représentés sur la figure 30 et pour les souches sauvage et xs_{2-2} sur la figure 31. On constate que les mutants ne sont pas plus thermosensibles que la souche d'origine. L'examen détaillé des courbes indiquerait même une plus grande résistance chez les mutants. La variabilité du pourcentage de la fraction thermorésistante influe sur la pente de la 1ère partie des courbes et explique partiellement cet effet.

Fig. 29 : Survies en fonction du temps d'exposition aux rayons gamma du ^{60}Co de souches haploïdes de type sauvage et X-sensibles traitées en phase stationnaire de croissance : (●) type sauvage (N 123) ; (▲) mutant rs_4 (S1437-11b) ; (■) mutant rs_{13} (S1448-3d). Le débit de dose est de 4300 r/min.

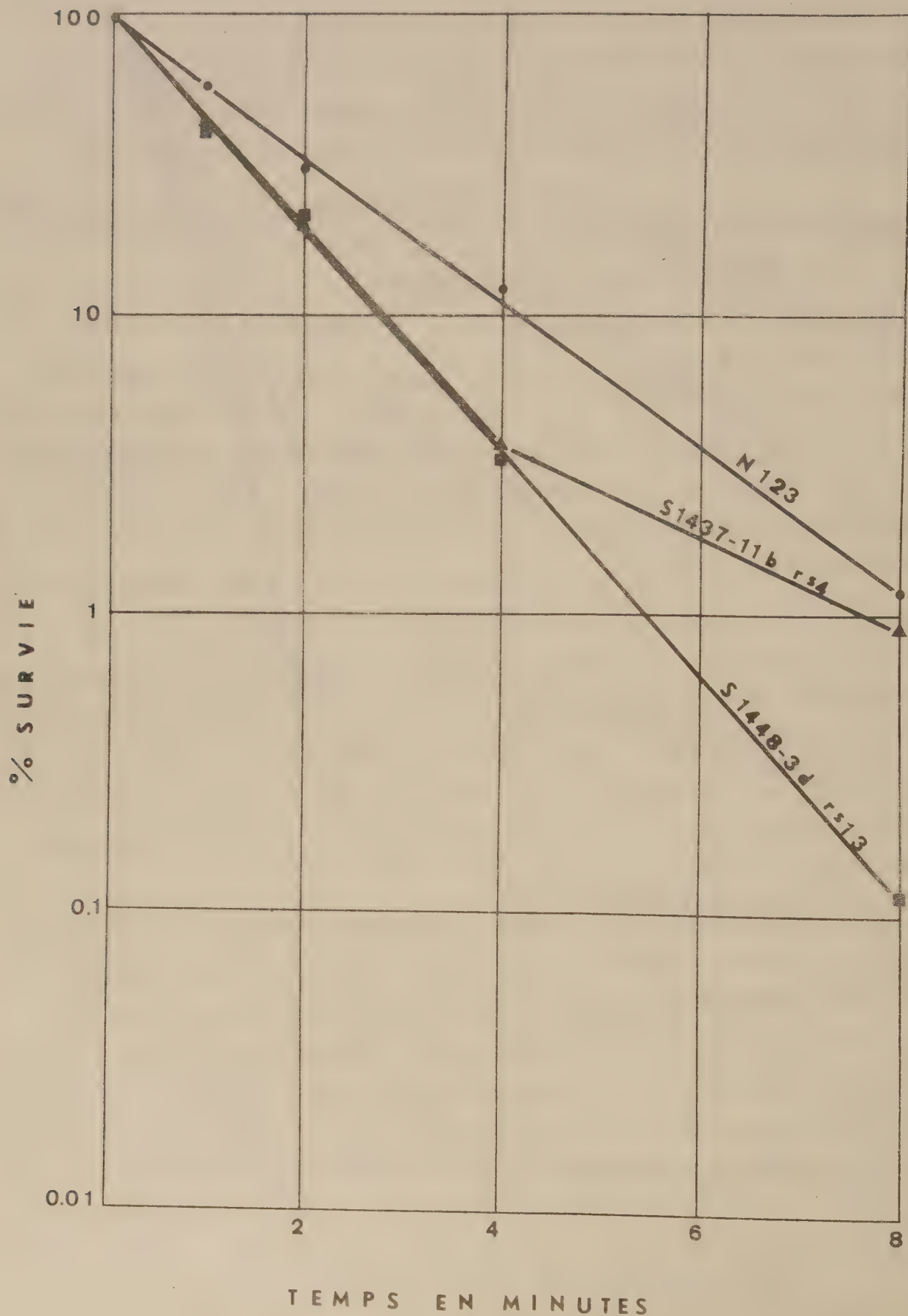


Fig. 30 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et X-sensibles traitées en phase de croissance exponentielle. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (X1687-101B) ; (▲) mutant xs_1 (KC376) ; (○) mutant xs_3 (KC410-4d). Les courbes en pointillé représentent l'étalement différé.

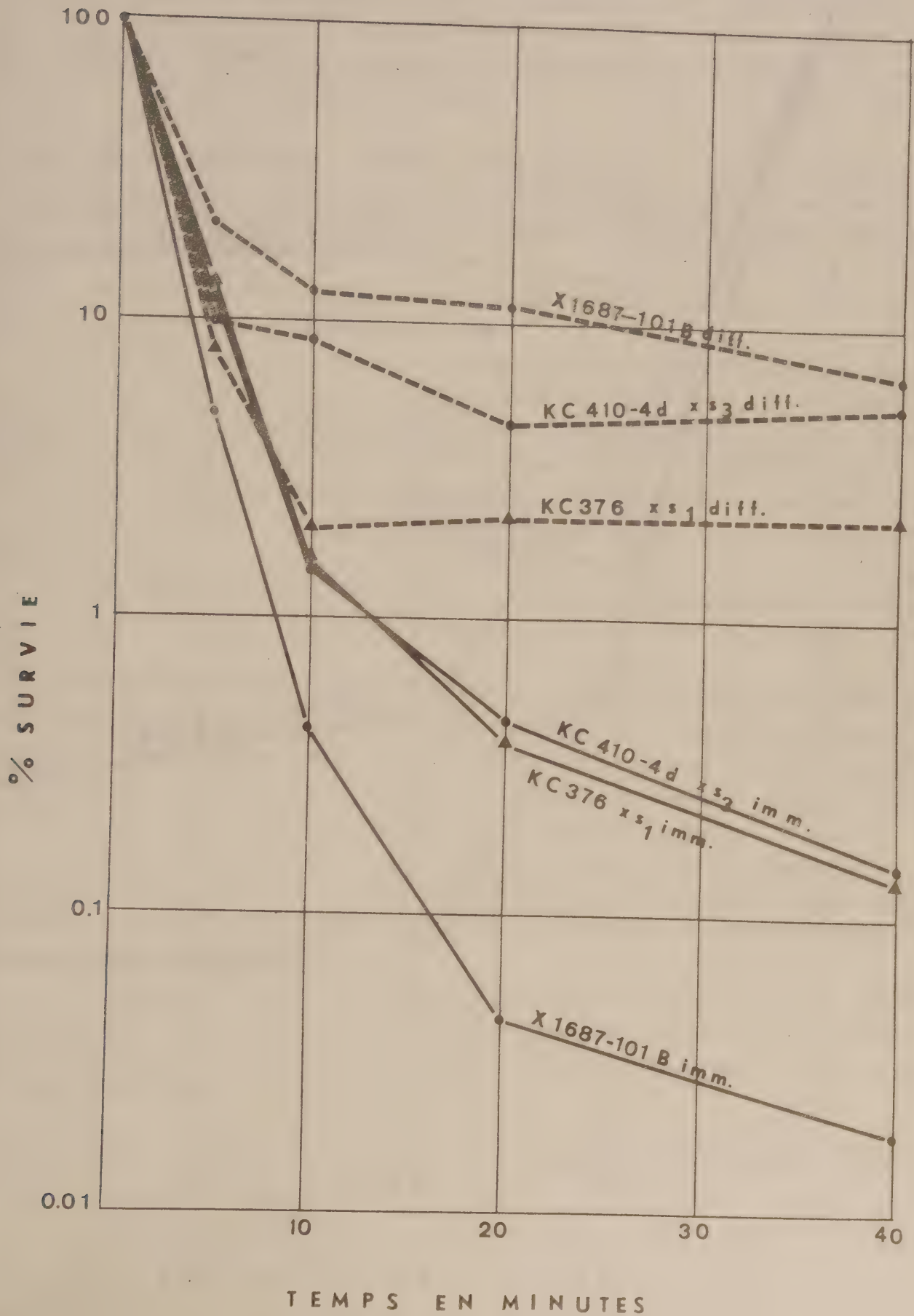
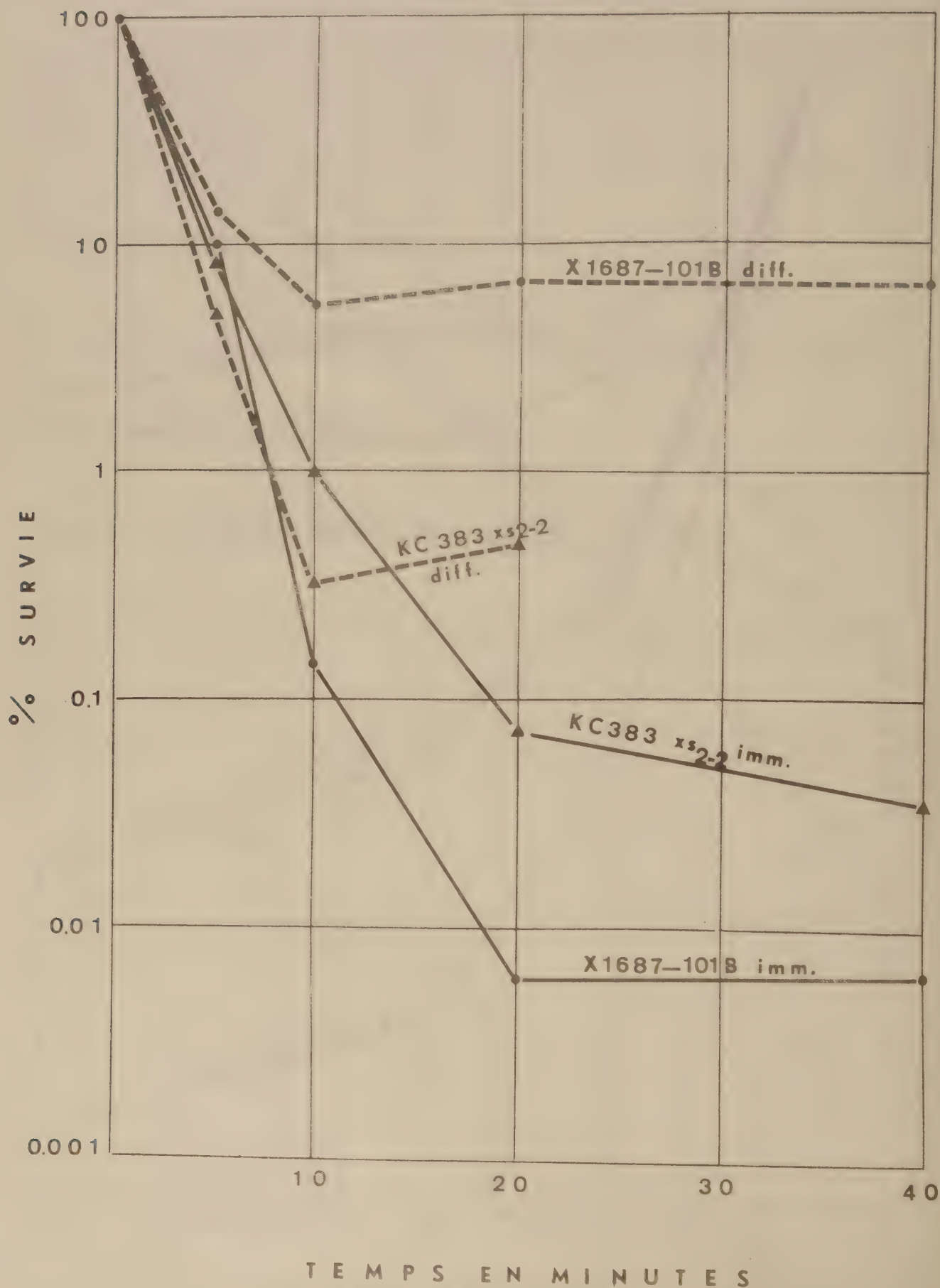


Fig. 31 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et X-sensible traitées en phase de croissance exponentielle. Réparation de l'effet létal : (●) type sauvage (X1687-101B) ; (▲) mutant xs_2-2 (KC383). Les courbes en pointillé représentent l'étalement différé.



Comme nous l'avons déjà vu pour les mutants de Snow, le niveau de réparation atteint est de toute manière plus bas pour les mutants que pour le type sauvage. Si on considère que la réparation des thermolésions est de nature enzymatique, ces résultats différentiels en ce qui concerne la réparation des thermolésions dans le cas des mutants, suggèrent que cette réparation est génétiquement contrôlée.

c) 3ème classe de souches : Mutants radiosensibles isolés par Zakharov (11)

La paire de souches étudiées est la suivante : P192, souche sauvage haploïde et P22 souche mutante radiosensible (xrs_5) haploïde dérivée de la première.

La mutation xrs_5 n'est pas allélique des autres mutations pour la radiosensibilité étudiées jusqu'ici (23).

Les courbes de survie à 52°C des deux souches, traitées en phase de croissance exponentielle sont présentées sur la figure 32. On constate que le mutant xrs_5 est plus sensible que le type sauvage à l'effet létal de 52°C ; c'est surtout entre les fractions thermorésistantes des deux souches que la différence devient notable : le FMD pour la 2ème partie des courbes est d'environ 3, tandis que pour la 1ère partie, il est égal à environ 1,3.

Ces mêmes cultures soumises à 52°C en phase de croissance stationnaire montrent un FMD de 5,5 par rapport au parent de type sauvage (fig. 33).

Si on compare ce FMD avec celui qui s'observe entre les courbes de survie aux rayons gamma du ^{60}Co de ces deux souches traitées en phase de croissance stationnaire (fig. 34), on voit que la souche mutante est environ 3 fois plus sensible à l'effet létal de la température supra-optimale qu'elle ne l'est à l'effet létal des radiations ionisantes.

La mutation xrs_5 n'est donc pas spécifique pour la sensibilité aux radiations ionisantes ; l'enzyme contrôlée par ce gène est aussi engagée dans le mécanisme qui conditionne le comportement vis-à-vis de la température supra-optimale.

De façon à réaliser une étude comparative plus précise, il faudrait pour poursuivre ce travail, utiliser des cultures synchronisées, puisque nous avons montré que la thermosensibilité d'une même souche varie au cours du cycle cellulaire.

Fig. 32 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et X-sensible traitées en phase de croissance exponentielle : (●) type sauvage (P192) ; (▲) mutant xrs_5 (P22).

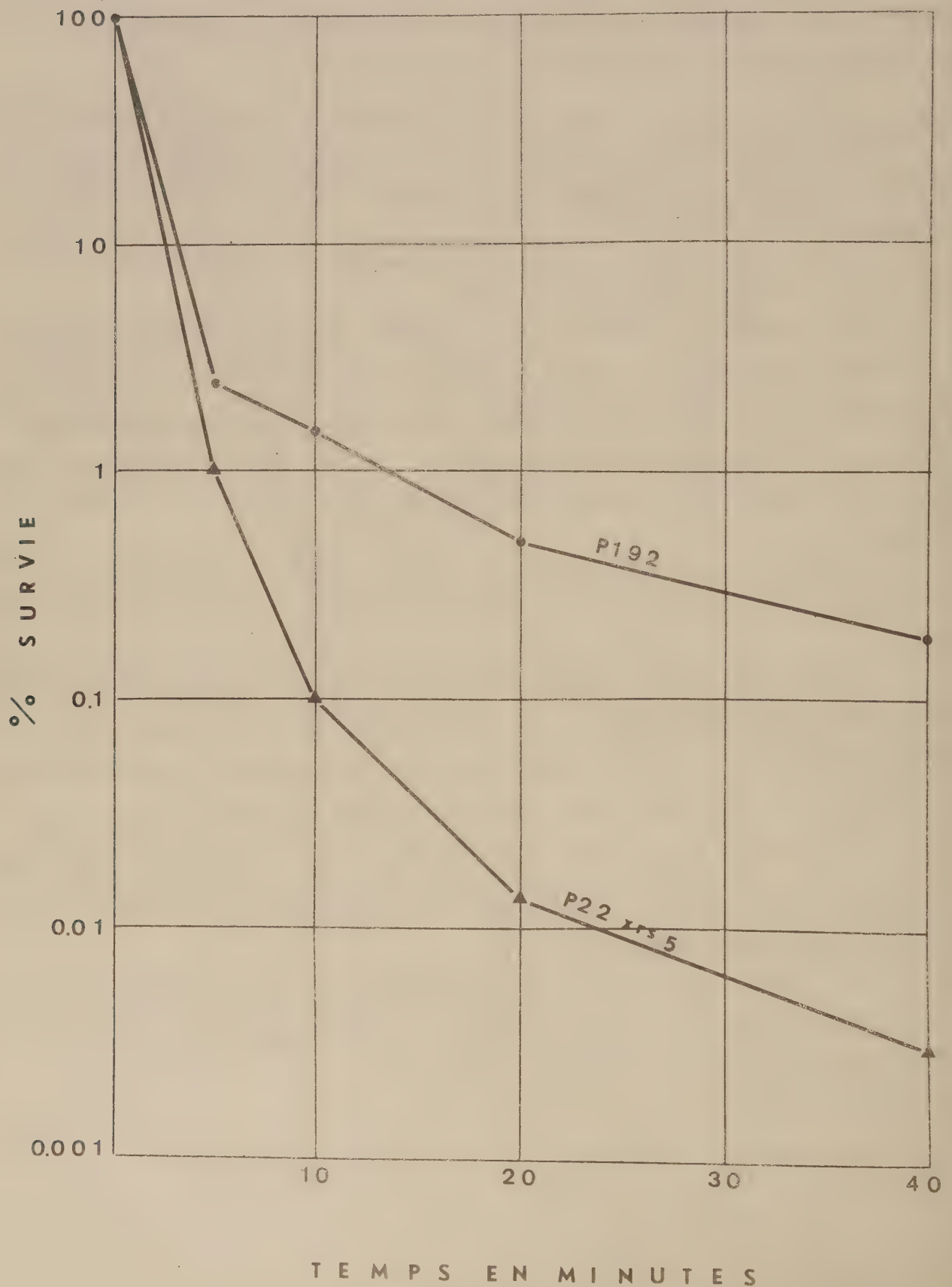


Fig. 33 : Survie en fonction du temps d'incubation à 52°C de souches haploïdes de type sauvage et X-sensible traitées en phase de croissance stationnaire : (●) type sauvage (P192) ; (▲) mutant xrs_5 (P22).

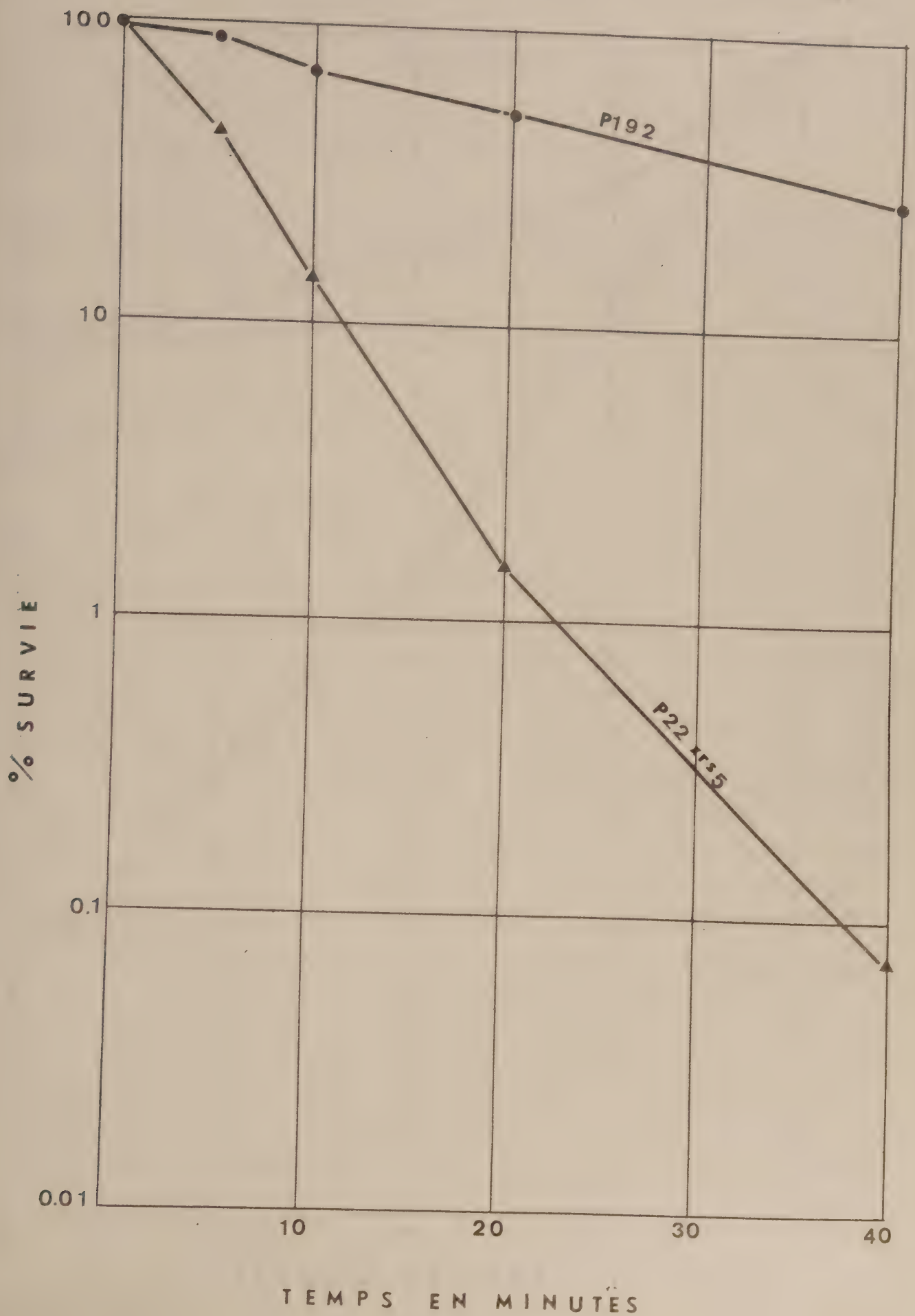
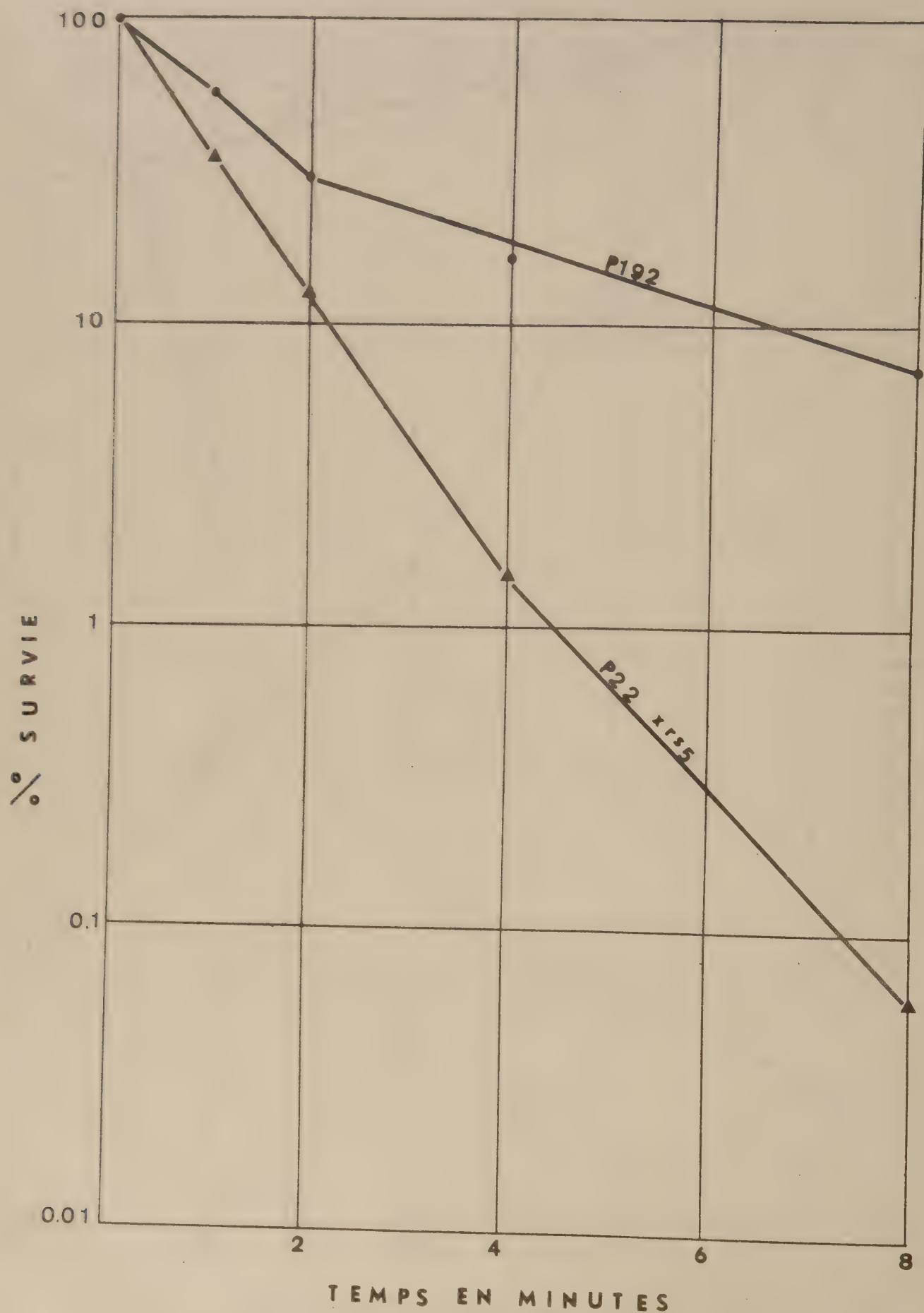


Fig. 34 : Survies en fonction du temps d'exposition aux rayons gamma du ^{60}Co de souches haploïdes de type sauvage et X-sensible traitées en phase stationnaire de croissance : (●) type sauvage (P192) ; (▲) mutant xrs_5 (P22). Le débit de dose est de 4300 r/min.



DISCUSSION

A - EFFET LETAL DE LA TEMPERATURE DE 52°C.

Nous avons vu que l'incubation à 52°C inactive exponentiellement les levures haploïdes, lorsqu'elles sont soumises au traitement thermique dans certaines conditions physiologiques définies. La courbe de survie est à deux composantes, la fraction thermorésistante de la population ne dépasse pas en général 0,1 %. Cette résistance n'est pas d'origine génétique. Nous avons constaté que, selon la phase de croissance, exponentielle ou stationnaire, le niveau de la cassure varie. Les cellules en phase stationnaire sont plus thermorésistantes que les cellules en voie de division.

Pour les virus traités in vitro, une courbe biphasique du même type est observée pour l'inactivation thermique. Dans ce cas également, la population est génétiquement homogène. La proportion de particules thermorésistantes varie en fonction de la température : lorsqu'on diminue celle-ci, la 2ème composante de la courbe, correspondante à la fraction résistante de la population, approche de 100 % (122). Ceci est contraire à l'idée d'une hétérogénéité inhérente à la population.

Deux types d'hypothèses sont invoquées pour expliquer l'allure biphasique des courbes d'inactivation thermique des virus :

1°) Les différents composants, protéines et acides nucléiques présenteraient une sensibilité différente à l'effet thermique. Cette hypothèse s'appuie sur la comparaison de la sensibilité du pouvoir infectieux et des propriétés immunologiques de certains virus ; les cinétiques d'inactivation de ces deux fonctions sont différentes dans certains cas (77-127).

2°) L'acide nucléique viral constitue la cible principale affectée par le chauffage. Les différents auteurs divergent ensuite dans leurs interprétations. Pour certains, une partie de l'inactivation est due à la rupture des liaisons hydrogènes (dénaturation ou "collapsus"), l'autre partie serait due à des effets plus localisés sur les bases par exemple (dépurination). Selon sa conformation, l'ADN serait plus sensible au premier de ces effets (122). D'autres suggèrent un enroulement non uniforme

de l'ADN dans la tête phagique ; les segments "externes", riches en A-T, sont plus sensibles que les segments "externes", riches en G-C, et ceux-ci sont plus sensibles que les segments d'ADN "centraux" (78).

Aucune de ces interprétations ne nous paraît pour l'instant convaincante. On rappelle (voir Introduction) que le facteur transformant du pneumocoque est également inactivé aux très hautes températures selon des courbes biphasiques et, dans ce cas, l'inactivation différentielle des protéines ne peut être invoquée. Par ailleurs, Latarjet et coll. (48) ont émis l'hypothèse que la courbe de survie biphasique du facteur transformant soumis aux radiations ou à certains peroxydes est due à l'inactivation du processus d'intégration du marqueur par l'hôte et à celle du marqueur lui-même. Dans le cas de l'inactivation thermique du facteur transformant, la même hypothèse semble raisonnable.

Quelles que soient les interprétations invoquées pour expliquer ces courbes, il est remarquable qu'un organisme dont l'ADN est organisé en chromosomes présente également ce type d'inactivation. L'état physiologique des cultures influe sur le niveau de la cassure de la courbe d'inactivation thermique des levures. Il nous paraît cependant prématuré dans l'état actuel de ce travail, étant donné l'ambiguïté qui existe encore pour des organismes aussi simples que les virus, de faire appel ici à de nouvelles hypothèses.

B - VARIATIONS DE LA SENSIBILITE A L'EFFET LETAL DU TRAITEMENT THERMIQUE AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE.

On a vu, à l'aide de cultures synchronisées, que la thermosensibilité varie au cours du cycle cellulaire. C'est au moment du bourgeonnement que la thermosensibilité, mesurée par la pente de la 1ère composante des courbes de survie à 52°C, devient maximale. On constate que la pente de la 1ère partie des courbes et celle de la 2ème, ainsi que le niveau de la cassure, varient en fonction du temps de croissance. La 1ère partie, exponentielle, des courbes de survie tend à présenter un épaulement quand les cellules sont en interphase (fig. 10). Ces différences de thermosensibilité pourraient être dues à différentes causes qui ne s'excluent pas d'ailleurs mutuellement :

1°) Le changement de conformation de l'ADN au cours de la division : Si on considère l'ADN comme la principale cible de la température supra-optimale, il est possible qu'au moment où se forment les fourches de réplication par exemple, la fragilité de l'ADN soit augmentée.

2°) L'aptitude à réparer les thermolésions pourrait varier au cours du cycle cellulaire. La conformation de l'ADN se prêterait plus favorablement à certains moments à ces processus de restauration ou bien la synthèse des enzymes de réparation pourrait elle-même varier cycliquement.

3°) La structure des membranes externe et nucléaire est modifiée au cours du cycle cellulaire (126). On peut penser que les sites d'association des ADN avec les lipo-protéines membranaires, requis pour l'accomplissement de la division (73), sont thermolabiles.

L'hypothèse d'une variabilité de l'aptitude à réparer les thermolésions nous paraît pour le moment la plus plausible. En effet, nous avons trouvé que les thermolésions sont très efficacement réversées et que l'aptitude à la réparation dépend des conditions physiologiques. Dans l'état actuel de nos connaissances, la réversibilité de différents types d'altérations au niveau de la molécule d'ADN est la mieux démontrée.

Des courbes de survie aux radiations ionisantes comparables à celles que nous observons pour l'effet létal de 52°C, tant du point de vue qualitatif (1ère partie exponentielle suivie d'une cassure), que quantitatif (FMD entre 1ère et 2ème parties), ont été décrites. Cependant, leur nature est fondamentalement différente.

En effet, dès 1930, Lacassagne et Holweck (43) avaient remarqué une plus grande radiorésistance des levures en bourgeonnement par rapport aux "cellules âgées". Beam et coll. (3) ont ensuite montré que la résistance de *Saccharomyces cerevisiae* haploïde aux effets létaux des rayons X augmente d'environ 20 fois au moment du bourgeonnement. On a vu que dans le cas de la température de 52°C, c'est au contraire la cellule à bourgeon qui est la plus sensible.

Ce qui diffère aussi de la situation que nous trouvons pour l'inactivation thermique, c'est qu'il y a une bonne correspondance entre le

point d'inflexion sur la courbe de survie aux rayons X et la proportion de cellules à bourgeons présente dans la population.

En ce qui concerne les lésions produites par les radiations ionisantes, les résultats de Moustacchi (59) suggèrent que certaines enzymes de réparation peuvent être synthétisées à certains stades spécifiques du cycle de division, ces enzymes pouvant être celles de la répllication de l'ADN. Des expériences récentes qui démontrent l'apparition cyclique d'ADN polymérase par exemple au cours de la multiplication synchronisée de levures (19) rendent cette idée plausible.

Ceci est à rapprocher de l'effet différentiel de la température supra-optimale au cours du cycle cellulaire. Si on considère que les mêmes enzymes sont requises dans la réparation des radiolésions et des thermolésions, la plus grande thermosensibilité au moment du bourgeonnement, contrairement à la radiosensibilité, s'expliquerait par une plus grande thermolabilité de ces enzymes au moment de leur synthèse.

Dans le cas où différentes enzymes seraient en cause dans la réparation des effets des 2 agents, la plus grande thermosensibilité des levures en bourgeonnement s'expliquerait :

- a - par un défaut de ces enzymes à ce stade ; elles pourraient être synthétisées préférentiellement à d'autres moments du cycle ;
- b - ou encore par une thermolabilité accrue de ces enzymes lors de leur production, au moment du bourgeonnement.

C - REPARATION DES THERMOLESIONS LETALES.

Nous avons trouvé que l'effet létal de l'incubation à 52°C peut être réparé avec une grande efficacité si on reproduit les conditions de "liquid holding recovery", phénomène connu pour les radiations (70-71). Patrick et coll. (35), en étudiant chez la levure la réparation des effets de différents agents, n'en trouvent pas pour ceux de la température. Ceci s'explique probablement par le fait qu'ils utilisent une température d'inactivation très élevée où la dénaturation des protéines se généralise et ceci serait irréversible.

Chez *Escherichia coli*, Bridges et coll. (9) n'ont pas trouvé de réparation des lésions létales de 52°C. Cependant, Mukherjee et

Bhattacharjee (62) travaillant à la même température et sur le même organisme décrivent une réparation dans des conditions de non croissance. Dans une communication personnelle récente, Bridges nous signale qu'il observe une réparation des thermolésions chez *Escherichia coli* dans des conditions physiologiques différentes.

1 - Cinétique de la réparation

Nous avons constaté que la cinétique de la réparation des thermolésions est complexe. La réparation est d'autant plus rapide que le nombre des lésions produites par l'action thermique est élevé (fig. 12). Ceci nous incite à penser que les thermolésions induisent peut-être les enzymes nécessaires à leur réparation. A partir d'un certain seuil, dans les cellules très atteintes, la synthèse de ces enzymes serait plus active et ceci entraînerait une augmentation de la vitesse de réparation.

2 - Effet du froid sur la réparation

La réparation des thermolésions n'a pas lieu à 4°C (fig. 13). Ceci indique qu'en effet des processus enzymatiques sont indispensables à cette réparation.

3 - Effet de l'inhibition de la synthèse protéique nucléaire

a) Blocage de la synthèse protéique avant le traitement thermique : Nous avons trouvé une protection vis-à-vis de l'effet létal immédiat du chauffage à 52°C si, avant le traitement thermique, on incube les cellules avec la cycloheximide à 1 µg/ml.

Hanawalt (34) a montré pour l'action létale des rayons UV sur *Escherichia coli* un phénomène analogue. Dans le cas d'*Escherichia coli* traitée aux rayons X, on a observé également une protection par le blocage de la synthèse protéique, cependant moins accentuée que pour les UV (5).

L'inhibition de la synthèse protéique entraîne un retard dans la reprise de la réplication normale de l'ADN (32). L'effet de protection vis-à-vis des radiations observé dans ces conditions s'explique par une possibilité accrue d'action pour les systèmes enzymatiques de réparation

des radiolésions. En effet, cette protection ne s'observe pas pour des mutants déficients dans les voies métaboliques de réparation des lésions produites par les UV (Hcr⁻) ou les rayons X (Exr⁻) (34 - 6). Par ailleurs, une compétition entre le système de répllication et celui de réparation par excision-resynthèse par exemple a été démontrée dans le cas des bactéries (80).

Sedliakova et coll. (92) ont montré chez *Escherichia coli* que, pour une souche sauvage traitée aux rayons UV, la synthèse de réparation s'effectue, que la synthèse protéique ait été inhibée (dans ce cas on observe une protection vis-à-vis des UV) ou non. Il est donc probable que c'est au niveau de la dernière étape de la chaîne des réactions enzymatiques de la réparation (activité ligasique) que les cellules incapables de se diviser ont un avantage par rapport à celles qui se divisent.

En résumé, les cellules soumises au blocage de la synthèse protéique avant l'irradiation termineraient leur cycle de répllication de l'ADN déjà initié et ne commenceraient le cycle suivant qu'après un certain retard. Ces deux conditions sont favorables à une meilleure réparation des lésions produites par les UV. La même explication est plausible pour la réparation des lésions provoquées par le traitement à la température de 52°C.

D'une manière analogue, cet effet favorable du retard de la division pour la réparation expliquerait également la thermorésistance accrue des cellules en phase stationnaire par rapport aux cellules en bourgeonnement. On sait que la période latente est plus longue pour les cellules en phase stationnaire. Cet allongement permettrait aux mécanismes de réparation d'agir plus efficacement sur les lésions de l'ADN.

Il nous semble que le blocage de la synthèse protéique remet les cellules jusqu'alors en croissance exponentielle, dans un état physiologique comparable à celui de cellules en phase stationnaire de croissance. Nous avons en effet remarqué que les cellules traitées par la cycloheximide présentent un plus faible pourcentage de bourgeons par rapport aux cellules témoins. Par ailleurs, nous avons vu que, dans l'étalement différé, les cellules pré-traitées à la cycloheximide ne sont pas mieux réparées que les cellules témoins.

b) Blocage de la synthèse protéique après le traitement thermique : On a vu que l'addition de cycloheximide à 1 µg/ml immédiatement après le traitement thermique inhibe totalement la réparation des thermolésions.

D'autre part, si la cycloheximide est ajoutée, à cette même concentration finale, à divers temps de conservation pour l'étalement différé, la réparation déjà accomplie s'exprime, mais toute réparation supplémentaire est inhibée. De nouvelles synthèses protéiques ont donc lieu au cours de la conservation pour l'étalement différé.

Sur la base de ces expériences cinétiques, on peut penser, soit qu'une protéine thermolabile ait été détruite et soit ensuite resynthétisée, soit que les thermolésions induisent elles-mêmes de nouvelles synthèses protéiques nécessaires à leur réparation.

Le fait que le pré-traitement à la cycloheximide n'influe pas sur la réparation de l'effet létal du chauffage à 52°C nous incite à favoriser l'hypothèse d'une synthèse induite.

Une telle situation n'est pas unique : Westergaard a montré chez *Tetrahymena* que l'irradiation aux UV ou la carence en thymine induisent une synthèse d'ADN polymérase de réparation (115). D'autre part, des nucléases qui utilisent spécifiquement comme substrats des ADN irradiés ou traités par des agents alkylants ont été identifiées (93-109).

Chez *Salmonella thyphimurium* également on a montré que la réparation des thermolésions est dépendante de la formation de nouvelle(s) protéine(s) (112).

La découverte chez *Staphylococcus aureus* d'une inhibition de la réparation des lésions induites par l'incubation à 55°C par l'actinomycine D (37) a conduit à une étude approfondie de l'effet thermique sur les ARN.

Rosenthal et Iandolo (88) ont ainsi démontré que les ribosomes sont dégradés par action thermique, la sous-unité 30 S étant sélectivement attaquée. L'ARN ribosomal 16 S est détruit et la structure secondaire de l'ARN 23 S est altérée. Sogin et Ordal (106) ont trouvé que, pendant la période de réparation des thermolésions provoquées par 15 minutes d'incubation à 55°C, les ribosomes et l'ARN ribosomal sont régénérés. Tomlins et Ordal (112) ont montré récemment que la synthèse d'ARN ribosomal est indispensable pour la réparation des thermolésions chez *Salmonella typhimurium*, sans toutefois constituer l'étape limitante du processus. Cette étape limitante consisterait en la synthèse d'une protéine, qu'ils présument engagée dans la formation des ribosomes.

Il n'est cependant pas exclu par ces études que de tels effets sur les ARN ribosomiaux puissent être consécutifs à des altérations primaires sur l'ADN ribosomal. Par ailleurs, on a récemment montré chez un protozoaire cilié que le choc thermique interrompt complètement la synthèse d'ADN nucléaire, puis celle-ci reprend, après une courte période de restauration, lorsqu'on remet les cellules à la température normale de croissance (21).

D - EFFET MUTAGENE DE LA TEMPERATURE DE 52°C.

1 - MUTATIONS CYTOPLASMIQUES

Nous avons vu que l'incubation à 52°C des mutants déficients ^{induit} respiratoires "petite colonie". Ce phénomène avait déjà été étudié par Sherman (96). Il a montré que les mutants "petite colonie" obtenus par choc thermique et par la croissance à des températures supra-optimales sont du même type que les "petites colonies" végétatives spontanées ou induites par action de l'acriflavine, c'est-à-dire que la grande majorité des "petites" induites sont de nature cytoplasmique et non génique. D'autre part, il remarqua que les "petites" sont plus sensibles à l'inactivation thermique que les cellules normales.

Plusieurs autres exemples de mutants non-mendéliens induits par le traitement thermique sont cités dans la littérature, aussi bien chez les organismes unicellulaires (79-107-39) que chez les multicellulaires (53)

Nous avons poursuivi l'étude de l'effet mutagène cytoplasmique de la température supra-optimale par différentes approches.

a) Variation de thermosensibilité à l'effet mutagène au cours du cycle cellulaire : Nous avons constaté que l'inductibilité de la mutation "petite colonie" par la température de 52°C varie considérablement au cours du cycle cellulaire. La variation de sensibilité à l'effet mutagène accompagne la variation de sensibilité à l'effet létal. On note cependant que l'amplitude des modifications de la thermosensibilité à l'effet mutagène est beaucoup plus élevée que pour l'effet létal. D'après la figure 10, le FMD est au maximum égal à 2 pour l'effet létal, alors que pour l'effet mutagène cytoplasmique (fig. 16) il est au moins 10 fois plus

élevé (courbes I et IV par exemple). C'est au moment du bourgeonnement que la thermosensibilité devient maximale.

b) Réparation des lésions mutagènes : Ayant observé une réparation très importante des lésions mutagènes de 52°C dans certaines conditions de conservation des cellules (eau bidistillée, 28°C, aération) après le traitement thermique, nous avons essayé de préciser la nature de cette réparation.

b-1) Cinétique de la réparation : On a constaté que les lésions mutagènes cytoplasmiques de 52°C sont réparées selon une courbe complexe (fig. 17) et beaucoup plus rapidement que les lésions létales.

b-2) Effet du froid : Le maintien à 4°C des cellules traitées à 52°C empêche la réparation.

b-3) Effet du blocage de la synthèse protéique nucléaire : En employant la cycloheximide à 1 µg/ml, nous avons constaté que :

- 1 - Le blocage avant le traitement thermique diminue l'induction des "petites colonies" et n'empêche pas la réparation des lésions mutagènes.
- 2 - Le blocage après le traitement thermique empêche partiellement la réparation.

Si les cellules sont pré-traitées à la cycloheximide et que celle-ci est également présente après le traitement thermique, la réparation est complètement inhibée.

Les conclusions de cet ensemble de résultats sont les suivantes .

- I - Existence d'un contrôle nucléaire de l'induction et de la réparation des mutants cytoplasmiques.

La synthèse d'ADN nucléaire est discontinuée (118), alors que la synthèse d'ADN mitochondrial est continue au cours du cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (120). Les autres synthèses macromoléculaires, ARN et protéines, sont continues (119). Comme nous avons constaté

que la thermosensibilité à l'induction de la mutation cytoplasmique "petite colonie" varie d'une manière cyclique et que le maximum de sensibilité correspond à la phase de synthèse de l'ADN nucléaire, on est amené à penser que la thermo-induction est peut-être sous contrôle nucléaire. Toutefois, nos expériences ne permettent pas d'exclure l'éventualité d'une dépendance de la thermo-induction vis-à-vis de toute autre structure cellulaire (membranes, enzymes spécifiques, etc...) qui évoluerait cycliquement en parallèle.

Par ailleurs, nous avons vu que le blocage de la synthèse protéique commandée par le noyau avant le traitement thermique diminue l'induction des "petites colonies" et n'affecte pas leur réparation. Or, Grossman et coll. (31) ont montré que la cycloheximide, même employée à de fortes concentrations (200 µg/ml), ne bloque pas la synthèse d'ADN mitochondrial. Un retard à la synthèse d'ADN mitochondrial n'explique donc pas l'effet de protection de la cycloheximide, contrairement à ce que l'on a vu pour la survie (paragraphe C-3, p. 44).

Deux mécanismes différents peuvent être à l'origine des mutants "petite colonie" sous l'effet du traitement thermique :

a) A 52°C la ségrégation des mitochondries de la cellule-mère vers le bourgeon pourrait être altérée. La cycloheximide, en retardant la division nucléaire et cellulaire par rapport à la division mitochondriale favoriserait une distribution équilibrée des mitochondries dans la cellule-fille, conduisant à un clone normal.

b) Le chauffage provoquerait des altérations au niveau des molécules d'ADN mitochondrial. Une ou plusieurs protéines nucléaires seraient nécessaires à la production et à l'établissement d'ADN mitochondriaux altérés (nucléases par exemple). Le pré-traitement à la cycloheximide inhiberait la synthèse de ces protéines et protégerait donc vis-à-vis de l'induction de mutants.

Le blocage de la synthèse protéique nucléaire par la cycloheximide après le traitement thermique inhibe la réparation. Par conséquent, la réversibilité de l'effet mutagène est également sous contrôle nucléaire : une protéine codée par l'ADN chromosomique serait nécessaire à la réparation des lésions mutagènes cytoplasmiques.

Dans le cadre des deux hypothèses invoquées pour expliquer l'origine des mutants "petite", l'absence d'inhibition de la réparation par le pré-traitement à la cycloheximide s'explique aussi bien par l'une ou l'autre de ces possibilités. En effet, la ségrégation des mitochondries se poursuivrait normalement au cours de la conservation après le traitement thermique (hypothèse a). Ou bien la (ou les) protéines nécessaires à la réparation sont différentes de celles requises pour l'induction, ou, s'il y a une étape commune pour l'induction et la réparation, ces protéines seraient resynthétisées au cours de la conservation (hypothèse b).

Le fait que le pré-traitement associé à un post-traitement à la cycloheximide empêche complètement la réparation est lui en contradiction avec l'hypothèse a : on s'attendrait en fait dans ce cas à une meilleure réparabilité. En revanche, ce dernier résultat est en accord avec l'hypothèse b. L'accentuation de l'inhibition de la réparation par la cycloheximide si elle est présente avant et après le traitement thermique, indiquerait qu'un faible nombre de molécules protéiques de réparation serait présent avant le chauffage, la grande majorité étant cependant synthétisée en réponse au chauffage. C'est à ce niveau qu'agirait la cycloheximide ajoutée après le chauffage.

II - Nature enzymatique de la réparation.

Les résultats obtenus sur l'effet du froid et de la cycloheximide sur la réparation des lésions mutagènes de la température de 52°C indiquent que ce système de réparation, contrôlé par le noyau, est de nature enzymatique.

2 - MUTATIONS NUCLEAIRES

Selon l'organisme étudié et le type de mutants recherchés, l'influence de la température sur l'apparition de mutations peut-être très variée.

Un accroissement du nombre de mutants sous l'effet d'une élévation de température a été décrit dès 1928 dans le cas de la Drosophile (63-76). De même, Freese a démontré une forte induction de mutants "plaques claires" pour le bactériophage T4 à pH 5 et 45°C (22), et Drake a rapporté un tra-

vail de Krieg qui décrit l'apparition de mutations par substitution pour ce même phage traité à 44°C à pH neutre (18). Enfin, Zamenhof et Greer (128-129) ont démontré une induction de mutants "aller" par traitement thermique d'*Escherichia coli*.

En revanche, il a été montré que le gène miniature-3-gamma de *Drosophila*, qui est instable, est peu affecté par des variations de température (16). D'autres auteurs ont enfin signalé une diminution de la fréquence des mutations avec une élévation de température. Ainsi, Beale et Fabergé (2) ont trouvé chez le végétal *Portulaca grandiflora* soumis à des températures croissantes jusqu'à 40°C, une réduction statistiquement significative de la fréquence de mutations. Le même effet a été observé chez *Zea mays* (84).

Nous avons trouvé chez *Saccharomyces cerevisiae* une induction, par l'incubation à 52°C, de la mutation nucléaire qui détermine la résistance à la canavanine. Un tel effet mutagène a une amplitude 20 fois plus grande lorsque les cellules traitées sont en phase de croissance exponentielle que lorsqu'elles sont en phase stationnaire. Cet effet mutagène nous a conduits à considérer l'ADN comme l'un des sites finalement touchés par le traitement thermique. Les expériences de synergisme entre les rayons UV et le traitement thermique aboutissent à la même conclusion. Chez *Escherichia coli*, Sideropoulos et coll. (97) ont observé un synergisme entre l'irradiation ultraviolette et l'incubation à 50°C pour l'induction de mutants résistants à la streptomycine. Dans leurs conditions expérimentales (30 secondes à 50°C) il n'y avait pas d'induction de mutants par le seul traitement thermique et les UV seuls exerçaient un faible effet mutagène. Cet effet était fortement accentué quand les 2 agents étaient appliqués. L'induction des mutants était beaucoup plus prononcée pour des cellules traitées en phase de croissance logarithmique que pour des cellules en phase stationnaire. Ces auteurs suggérèrent que les rayons UV et la température supra-optimale agissent sur les mêmes sites cellulaires.

Le mécanisme de la production de mutations par le chauffage a été étudié par Greer et Zamenhof (27). Ils ont trouvé que le traitement thermique à des pH physiologiques provoque la dépurination de l'ADN ; ceci pourrait expliquer la mutagénèse. Dans les conditions où le rendement en mutants est le plus élevé (cellules végétatives d'*Escherichia coli* à l'état sec dans le vide chauffées à 155°C pendant 15 minutes), ils calculent qu'en

moyenne 1,5 molécules de purines sont libérées pour 500 paires de nucléotides. La dépurination se ferait probablement par la cassure pyrolytique de la liaison N-glycosidique ou/et la destruction du désoxyribose. Le traitement thermique provoque donc des altérations très spécifiques au niveau de la molécule d'ADN et, d'après ces auteurs, ceci pourrait expliquer la mutagénèse spontanée, en absence de division.

On note incidemment, que Skobkin (101) a observé pour la mutation $\text{can}^S \rightarrow \text{can}^R$ une plus grande radiorésistance des cellules en bourgeonnement chez *Saccharomyces cerevisiae* haploïde. On rappelle que cette radiorésistance se manifeste également pour l'effet létal. Nous constatons, au contraire, une thermosensibilité généralisée dans les cellules en bourgeonnement : la sensibilité à l'effet létal aussi bien que la sensibilité à l'effet mutagène nucléaire et cytoplasmique atteignent un maximum dans ces cellules.

E - COMPARAISON ENTRE RADIO ET THERMOSENSIBILITES.

Nous rappelons les résultats obtenus par cette étude comparative des sensibilités à l'effet létal de 52°C de différents mutants radiosensibles et de leurs types sauvages d'origine.

1°) Le mutant UV sensible (rad_1) a la même thermosensibilité que le type sauvage dont il dérive. La réparation des thermolésions est du même ordre de grandeur pour les deux types de souches.

2°) Les mutants UV et X sensibles étudiés (rad_6 et rad_{18}) ne sont pas thermosensibles par rapport au type sauvage d'origine. La réparation des thermolésions a la même ampleur chez la souche sauvage que chez le mutant rad_6 .

3°) La caféine à 1,2 mg/ml n'a pas d'effet sur la réparation, ni des lésions létales, ni sur celle des lésions mutagènes cytoplasmiques consécutives au traitement à 52°C d'une souche sauvage.

4°) Parmi les 6 différents mutants X sensibles étudiés, un seul s'est montré thermosensible (xrs_5). Pour les 5 autres mutants, le niveau de

la cassure des courbes de survie est généralement plus élevée que pour le type sauvage, ce qui se traduit par une thermorésistance apparemment plus élevée. Ceci veut dire que la proportion des cellules thermorésistantes est plus grande pour une même durée de croissance chez les mutants X sensibles par rapport à la souche sauvage. L'examen des courbes de croissance que j'ai effectuées dans quelques cas a montré que, pour un même milieu complet, les mutants arrivent en phase stationnaire plus tôt que le type sauvage. Le facteur limitant pour la croissance de ces souches pourrait être différent de celui qui limite la croissance du type sauvage (le glucose). On constate de plus que l'ampleur de la réparation est moins grande pour les mutants comparativement au type sauvage.

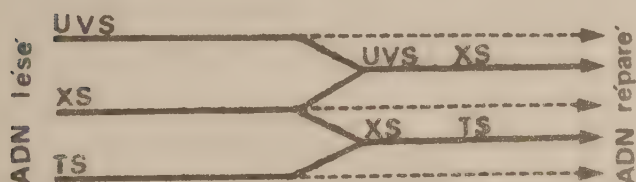
La réparation des lésions produites par les radiations ionisantes s'effectue par plusieurs enzymes engagées dans une ou probablement plusieurs voies métaboliques. Chacune de ces enzymes est contrôlée par un gène. Dans la mesure où les souches que nous avons comparées sont isogéniques, exception faite pour la mutation de radiosensibilité, nous pouvons tirer les conclusions suivantes d'après l'ensemble des résultats :

- Les enzymes de réparation des radiolésions contrôlées par les allèles dominants des gènes rad_1 , rad_6 , rad_{18} , xs_1 , xs_2 , xs_3 , rs_4 et rs_{13} n'interviennent pas dans l'expression immédiate des lésions létales provoquées par l'incubation à la température de 52°C.
- L'enzyme contrôlée par l'allèle dominant du gène xrs_5 par contre, n'est pas spécifique pour la seule sensibilité aux lésions induites par les radiations ionisantes ; cette enzyme est également engagée dans l'expression des thermolésions.
- On a vu, par ailleurs, que les gènes de sensibilité aux radiations ionisantes bloquent partiellement la réparation différée des thermolésions. Ceci nous incite à penser qu'il existe peut-être plus d'un système de réparation des thermolésions. La différence des survies entre le type sauvage et un mutant (xrs_5) suggère fortement l'existence d'un premier système de réparation, qui fonctionne dès l'étalement immédiat. Ce système serait intact chez les souches X sensibles qui montrent la même survie à la température de 52°C que le type sauvage (xs_1 , xs_2 , xs_3 , rs_4

et rs₁₃). Un 2ème système de réparation des thermolésions, agissant pendant la période de conservation pour l'étalement différé, serait en partie déficient chez ces mutants X sensibles. L'existence d'au moins deux voies de réparation des lésions des rayons UV chez *Saccharomyces cerevisiae* est plausible d'après les résultats de Moustacchi et Entéric (61).

- L'inefficacité de la caféine à la concentration employée est en accord avec l'absence de corrélation entre l'UV et la thermosensibilité. Si l'on admet que la caféine pénètre dans les cellules (61), on peut envisager au moins 2 explications pour cette absence d'effet. Si l'on considère que l'inhibition de la réparation des lésions UV par la caféine est due à une action de cette substance sur les enzymes de réparation (98 - 94), nos résultats suggèrent que, dans la réparation des thermolésions, différente(s) enzyme(s) sont engagée(s). Selon une autre hypothèse non exclusive, on admet que l'action inhibitrice de la caféine se produit par le masquage de la lésion provoquée par les rayons UV, celle-ci ne pouvant alors être reconnue par les enzymes de réparation (17). Nos résultats indiquent que les thermolésions sont d'une autre nature que celles induites par les rayons UV et ne sont donc pas passibles d'être masquées par la caféine. La réparation se poursuit alors normalement en présence de cette drogue.

Nous pensons que, pour expliquer nos résultats en ce qui concerne la sensibilité aux rayons UV, aux rayons γ et à la température de 52°C, le schéma suivant s'impose :



3 voies convergentes de réparation
qui partagent des étapes communes
deux à deux

Ainsi, il y aurait certaine(s) étape(s) de la réparation commune(s) aux lésions des rayons UV et des radiations ionisantes, d'autres étapes communes aux lésions des radiations ionisantes et de 52°C et des voies indépendantes de réparation des effets de ces différents agents. En effet,

Parry, chez *Saccharomyces cerevisiae* et Abbondandolo, chez *Schizosaccharomyces pombe*, ont trouvé des mutants sensibles à une température supra-optimale, qui ne sont pas radiosensibles (communications personnelles).

Ces résultats montrent que les évidences obtenues chez les bactéries ne sont pas directement extrapolables aux organismes eucaryotes. En effet, Bridges et coll. (9) ont trouvé chez différents mutants bactériens une corrélation frappante entre radio et thermosensibilités. Or, nous voyons sur *Saccharomyces cerevisiae*, chez qui, contrairement au cas des mutants d'*Escherichia coli* étudiés, on a examiné des mutants X sensibles et UV-résistants, qu'une corrélation de ce type peut exister, sans toutefois être une règle générale.

Nos résultats élargissent à un eucaryote et aux effets d'un agent physique, l'élévation de la température, le spectre d'action des systèmes enzymatiques de réparation des lésions du génome, système qui, comme cela avait déjà été démontré dans le cas des bactéries, restaurent les dommages provoqués par les radiations et certains agents chimiques (103)

PERSPECTIVES

Le présent travail permet d'envisager les effets thermiques chez la levure sous des angles nouveaux. Depuis que Patrick et coll., en 1964, n'ayant pas trouvé de réparation pour l'effet létal à 60°C sur *Saccharomyces cerevisiae*, avaient attribué les lésions de la température aux seuls composants cellulaires protéiques (71), peu de travaux concernant les effets thermiques et leur réparation étaient parus. Notre travail a montré que l'ADN est probablement en cause et que la thermosensibilité est physiologiquement et génétiquement contrôlée.

Pour approfondir cette étude, il serait utile de déterminer si l'ADN chauffé subit par exemple des changements de poids moléculaire et de suivre les modifications de biosynthèse des macromolécules après le traitement thermique parallèlement à la survie. Une autre approche serait d'examiner si les analogues de bases de l'ADN sensibilisent ou non les levures à l'effet thermique. Une étude de l'action de la haute température sur les recombinaisons génétiques pourrait également apporter des rensei-

gnements intéressants, d'autant plus que chez *Pseudomonas*, la température élevée exerce des effets sur la recombinaison qui ont été corrélés avec les enzymes de restriction (87).

Par ailleurs, il faudrait mieux comprendre le mécanisme par lequel la température supra-optimale induit les mutants cytoplasmiques "petite colonie". L'examen sur des gradients de sucrose alcalins du poids moléculaire de l'ADN mitochondrial après traitement thermique et extraction des mitochondries pourrait être réalisé.

Finalement, il faudrait mieux caractériser la réparation des effets létaux et mutagènes de l'incubation à 52°C. On pourrait, dans cette optique, examiner l'action sur la réparation d'inhibiteurs spécifiques de la synthèse protéique mitochondriale (tel que le chloramphenicol), de celle des ARN (tels que la rifampycine, le 5-fluorouracile et l'actinomycine D), de l'ADN (tel que l'acide naldixique), de la membrane (tel que la cyclose-rine) et des inhibiteurs énergétiques comme le 2-4-dinitrophénol.

La découverte récente chez la *Drosophila* d'une induction de non-disjonctions des chromosomes sexuels par une augmentation de température d'à peine 10°C (28) incite à approfondir les études sur le mode d'action des variations de température sur les organismes vivants. On pense à l'heure actuelle que, même chez l'homme, des variations saisonnières de température peuvent influencer sur la fréquence des aneuploïdies (65).

Par ailleurs, il a été démontré que les cellules cancéreuses sont thermosensibles par rapport aux cellules normales. La perte de l'inhibition de contact s'accompagne d'une thermosensibilité accrue (49-24). Ceci constitue une raison supplémentaire pour approfondir les connaissances sur les effets thermiques et leur réparation.



RESUME

Au cours de ces dernières années, divers travaux sur *Escherichia coli* incitent à penser que les systèmes enzymatiques de réparation des radiolésions ont une potentialité d'action étendue aux altérations du génome, provoquées par des agents chimiques et physiques autres que les radiations. Cette notion nous a guidés dans le présent travail sur les effets de la température. Il s'est avéré indispensable en cours d'étude de mieux préciser les modalités d'action de cet agent relativement peu étudié jusqu'ici sur la levure.

La thermosensibilité vis-à-vis de l'effet létal et mutagène nucléaire et cytoplasmique varie au cours de la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

A l'aide de cultures synchronisées, on montre que la phase la plus thermosensible coïncide avec l'apparition de cellules à bourgeons (phase S). Il est frappant de constater que la situation inverse s'observe dans le cas des radiations ionisantes : les cellules à bourgeons sont les plus radiorésistantes (3).

Ces effets de la température supra-optimale sont réversibles, autrement dit, si l'étalement des cellules traitées est différé, on récupère davantage de survivants, et la fréquence des mutants devient négligeable, par rapport à l'étalement fait immédiatement après le traitement.

Cette réparation des effets thermiques a lieu en absence de division, elle nécessite un métabolisme cellulaire. Par exemple, elle est inhibée si les cellules sont conservées à 4°C. De plus, une synthèse protéique d'origine nucléaire est indispensable pour que cette réparation s'effectue. En effet, l'addition d'un antibiotique (cycloheximide), qui bloque spécifiquement les synthèses protéiques contrôlées par le noyau, empêche la réparation des effets létaux et mutagènes cytoplasmiques de la température élevée.

L'étude des cinétiques de la réparation en absence et en présence de cycloheximide conduit à penser que cette synthèse protéique est peut-être inductible par les thermolésions.

L'existence d'un effet mutagène nucléaire de la température de 52°C et la réversibilité de cet effet indiquent que l'ADN est l'une des cibles principalement affectées. La possibilité que le (ou les) site(s) initialement touché(s) par l'effet thermique ne soit pas l'ADN lui-même n'a cependant pas été exclue.

Ce travail a été en partie entrepris dans le but de vérifier la généralité des observations de Bridges et coll. (9), qui constatent pour différentes bactéries que la sensibilité aux radiations ionisantes est accompagnée d'une thermosensibilité. J'ai comparé la thermosensibilité de différents mutants radiosensibles de *Saccharomyces cerevisiae* à celle des types sauvages correspondants. Parmi les 9 mutants, bloqués à différents niveaux des chaînes métaboliques de réparation, un seul s'est révélé thermosensible. Autrement dit, le parallélisme postulé par les auteurs précités n'est pas général, il reste peut-être valable seulement pour certaines étapes spécifiques des voies enzymatiques de réparation au moins chez la levure.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) AVERY, O.T., C.M. MAC LEOD et M. MAC CARTY, Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types- J. Exp. Med. 79 : 137-157 (1944).
- 2) BEALE, G.H., et A.C. FABERGE, Effect of Temperature on the Mutation Rate of an Unstable Gene in *Portulaca grandiflora*- Nature 147 : 356-357 (1941).
- 3) BEAM, C.A., R.K. MORTIMER, R. WOLFE et C. TOBIAS, The Relation of Radio-resistance to Budding in *Saccharomyces cerevisiae*- Arch. Biochem. Biophys. 49 : 110-122 (1954).
- 4) BEAMER, P.R. et F.W. TANNER, Heat Resistance Studies on Selected Yeasts- Zentr. Bakteriол. Parasitenk Abt II 100 : 202-211 (1939).
- 5) BILLEN, D., Alterations in the Radiosensitivity of *E. coli* through Modifications of Cellular Molecular Components- Biochim. Biophys Acta 34 : 110-116 (1959).
- 6) BILLEN, D. et L. BRUNS, Relationship between Radiation Response and the DNA Replication Cycle in Bacteria : Dependence on the Excision Repair System- J. Bacteriol. 103 : 400-403 (1970).
- 7) BRENDDEL, M., N.A. KHAN et R.H. HAYNES, Common steps in the Repair of Alkylation and Radiation Damage in Yeast- Molec. Gen. Genetics 106 : 289-295 (1970).
- 8) BRIDGES, B.A., M.J. ASHWOOD-SMITH et R.J. MUNSON, Susceptibility of Mild Thermal and of Ionizing Radiation Damage to the Same Recovery Mechanisms in *E. coli*- Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 : 193-196 (1969).
- 9) BRIDGES, B.A., M.J. ASHWOOD-SMITH et R.J. MUNSON, Correlation of Bacterial Sensitivities to Ionizing Radiation and Mild Heating- J. Gen. Microbiol. 58 : 115-124 (1969).

- 10) BURTON, K., A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of DNA- Biochem. J. 62 : 315-323 (1956).
- 11) BUTTIN, G. et M. WRIGHT, Enzymatic DNA Degradation in E. coli : Its Relationship to Synthetic Processes at the Chromosome Level, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 259-269 (1968).
- 12) BYFIELD, J.E. et O.H. SCHERBAUM, Suppression of RNA and Protein Accumulation by Temperature Shifts in a Heat-Synchronized Protozoan- Life Sciences, 5 : 2263-2269 (1966).
- 13) CARNEVALI, F., G. PIPERNO et G. TECCE, Satellite Components of DNA from a Cytoplasmic "Petite" Mutant of Saccharomyces cerevisiae- Rend. Sc. Fis. Mat. e Nat. 41 : 194-196 (1966).
- 14) COX, B.S. et J.M. PARRY, The Isolation, Genetics and Survival Characteristics of UV Light Sensitive Mutants in Yeast- Mut. Res. 6 : 37-55 (1968).
- 15) DAVIES, R., Observations on the Use of Ultra-Sound Waves for the Disruption of Microorganisms- Biochim. Biophys. Acta 33 : 481-493 (1959).
- 16) DEMEREC, M., Effect of Temperature on the Rate of Change of the Mutable Miniature-3-Gamma Gene of Drosophila virilis- Proc. Nat. Acad. Sci. US 18 : 430-434 (1932).
- 17) DOMON, M., B. BARTON, A. PORTE et A.M. RAUTH, The Interaction of Caffeine with Ultraviolet Light Irradiated DNA- Int. J. Rad. Biol. 17 : 395-399 (1970).
- 18) DRAKE, J.W., The Molecular Basis of Mutation, p. 176, Holden-Day, San Francisco, London, Cambridge, Amsterdam (1970).
- 19) ECKSTEIN, H., V. PADUCH et H. HILZ, Synchronized Yeast Cells, 3 : DNA Synthesis and DNA Polymerase After Inhibition of Cell Division by X-Rays.- Europ. J. Biochem. 3 : 224-231 (1967).

- 20) EPHRUSSI, B., H. HOTTINGER et J. TAVLITZKI, Action de l'Actiflavine sur les Levures, II : Etude Génétique du Mutant "Petite Colonie", Ann. Inst. Pasteur 76 : 419-442 (1949).
- 21) EVENSON, D.P. et D.M. PRESCOTT, Disruption of DNA Synthesis in Euplotes by Heat Shock, Exp. Cell Res. 63 : 245-252 (1970).
- 22) FREESE, E., On the Molecular Explanation of Spontaneous and Induced Mutations, Brookhaven Symp. 12 : 63-75 (1959).
- 23) GAME, J.C. et B.S. COX, Allelism Tests of Mutants Affecting Sensitivity to Radiation in Yeast and a Proposed Nomenclature, Mut. Res. 12 : 328-331 (1971).
- 24) GAUSE, G.F., E.M. NETYSKA, L.I. KUSOVKOVA et T.I. SELESNEVA, Temperature Sensibility of Cancerous Cells and its Study with the Aid of Microbiological Models, Izvestia Acad. Sci. USSR Ser Biol. 6 : 802-809 (1968).
- 25) GAUSE, G.F. et L.I. KUSOVKOVA, Temperature Sensitivity in the Respiratory Deficient Mutants of Yeast, - Experientia 26 : 209-210 (1970).
- 26) GINOZA, W. et B.H. ZIMM, Mechanisms of Inactivation of Deoxyribonucleic Acids by Heat- Proc. Nat. Acad. Sci. US 47 : 639-652 (1961).
- 27) GREER, S., et S. ZAMENHOF, Studies on Depurination of DNA by Heat- J. Mol. Biol. 4 : 123-141 (1962).
- 28) GRELL, R.F., Induction of Sex Chromosome Nondisjunction by Elevated Temperature, - Mut. Res. 11 : 347-349 (1971).
- 29) GRENSON, M., M. MOUSSET, J.M. WIAME et J. BECHET, Multiplicity of the Amino-Acid Permeases in Saccharomyces cerevisiae, I : Evidence for a Specific Arginine Transporting System- Biochim. Biophys. Acta 127 : 325-338 (1966).
- 30) GRIGG, G.W., Caffeine-Death in Escherichia coli- Molec. Gen. Genetics 102 : 316-335 (1968).

- 31) GROSSMAN, L.I., E.S. GOLDRING et J. MARMUR, Preferential Synthesis of Yeast Mitochondrial DNA in the Absence of Protein Synthesis- J. Mol. Biol. 46 : 367-376 (1969).
- 32) HANAWALT, P.C., Macromolecular Synthesis in a Thymine Requiring Bacterium after UV Irradiation- In Christensen, B.C. et B. Buchman (ed.) Progress in Photobiology, Elsevier Publishing Co, Amsterdam (1961) pp. 305-307.
- 33) HANAWALT, P.C. et R.H. HAYNES, Repair Replication of DNA in Bacteria : Irrelevance of Chemical Nature of Base Defect, Biochim. Biophys. Res. Commun. 19 : 462-467 (1965).
- 34) HANAWALT, P.C., The UV Sensitivity of Bacteria : Its Relation to the DNA Replication Cycle- Photochem. Photobiol. 5 : 1-12 (1966).
- 35) HAYNES, R.H., M.H. PATRICK et J.E. BAPTIST, Comparative Response of Radioresistant and Radiosensitive Strains of E. coli to Various Inactivating Agents- Rad. Res. 22 : 194 (1964).
- 36) HOWARD-FLANDERS, P. et R.P. BOYCE, DNA Repair and Genetic Recombination: Studies on Mutants of Escherichia coli Defective in these Processes- Rad. Res. Supp. 6 : 156-184 (1966).
- 37) IANDOLO, J.J. et Z.J. ORDAL, Repair of Thermal Injury of Staphylococcus aureus- J. Bacteriol. 91 : 134-142 (1966).
- 38) JACKSON, H. et M. WOODBINE, The Effect of Sub-Letal Heat Treatment on the Growth of Staphylococcus aureus,- J. Appl. Bacteriol. 26 : 152-158 (1963).
- 39) JINKS, J.L., Extrachromosomal Inheritance, p. 67, Prentice-Hall Foundations of Modern Genetics Series, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (1964).
- 40) JOHNSTON, J.R. et R. MORTIMER, Influence of Temperature on Recombination in Yeast- Heredity 22 : 297-303 (1967).

- 41) KAUFMANN, O.W., L.G. HARMON, O.C. PEILTHORF et I.J. PFULG, Effect of Heat Treatment on the Growth of Surviving Cells- J. Bacteriol. 78 : 834-838 (1959).
- 42) KILBEY, E.J. et S.M. SMITH, Similarities between a UV Sensitive Mutant of Yeast and Bacterial Mutants Lacking Excision-Repair Ability- Molec. Gen. Genetics 104 : 253-257 (1969).
- 43) LACASSAGNE, A. et F. HOLWECK, Sur la Radiosensibilité de la Levure *Saccharomyces ellipsoideus*- Compt. Rend. Soc. Biol. 104 : 1221-1223 (1930).
- 44) LANDNER, L., Variation of Recombination Frequency in *Neurospora crassa*, Following Temperature Changes Prior to and During Meiosis and Evidence for a Premeiotic Sensitive Stage,- Molec. Gen. Genetics 109 : 219-232 (1970).
- 45) LASKOVSKI, W., Der α Effekt, Eine Korrelation Zwischen Paarungstypkonstitution und Strahlenresistenz bei Hefen- Zbl. Bakt. Orig. 184 : 251-258 (1962).
- 46) LATARJET, R. et B. EPHRUSSI, Courbes de Survie de Levures Haploïde et diploïde Soumises aux Rayons X- Compt. Rend. Acad. Sc. 229 : 306-308 (1949).
- 47) LATARJET, R., P. MORENNE et R. BERGER, Un Appareil Simple pour le Dosage des Rayonnements Ultraviolets Emis par les Lampes Germicides- Ann. Inst. Pasteur 85 : 174-184 (1953).
- 48) LATARJET, R., H. EPHRUSSI-TAYLOR et N. REBEYROTTE, On the Target Size of a Transforming Factor Based on X-Ray Inactivation- Rad. Res. Supp. 1 : 417-430 (1959).
- 49) LEVINE, E.M. et E.B. ROBBINS, Differential Temperature Sensitivity of Normal and Cancer Cells in Culture- J. Cell. Physiol. 76 : 373-380 (1970).
- 50) LOUDERBACK, A.L., O.H. SHERBAUM et T.L. JAHN, The Effect of Temperature Shifts on the Budding Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*- Exp. Cell Res. 25 : 437-453 (1961).

- 51) MAC CLARY, D.O., W.L. NULTY et G.R. MILLER, Effects of Potassium versus Sodium in the Sporulation of *Saccharomyces*.- *J. Bacteriol.* 78 : 362-368 (1959).
- 52) MAC GRATH, R.A., R.W. WILLIAMS et C.S. SWARTZENDRUBER, Breakdown of DNA in X-Irradiated *E. coli*- *Biophys. J.* 6 : 113-122 (1966).
- 53) MAGNI, G.E., Thermic Cure of Cytoplasmic Sex-Ratio in *Drosophila bifasciata*- *Caryologia (Supp.)* 6 : 1213 (1954).
- 54) MARMUR, J. et R. DOTY, Heterogeneity in Deoxyribonucleic Acids. I : Dependence on Composition of the Configurational Stability of Deoxyribonucleic Acids, *Nature* 183 : 1427-1429 (1959).
- 55) MELCHIOR, D.L., H.J. MOROWITZ, J.M. STURTEVANT et T.Y. TSONG, Characterization of the Plasma Membrane of *Mycoplasma laidlawii*- VII : Phase Transitions of Membrane Lipids- *Biochim. Biophys. Acta* 219 : 114-122 (1970).
- 56) MITCHISON, J.M. et W.S. VINCENT, Preparation of Synchronous Cell Cultures by Sedimentation- *Nature* 205 : 987-989 (1965).
- 57) MOUNOLOU, J.C., Rôle d'un ADN Spécifique dans le Déterminisme Génétique et Physiologique des Mitochondries de la Levure, Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles, Faculté des Sciences de Paris (1967).
- 58) MOUSTACCHI, E., "L'Effet Oxygène" dans l'Irradiation X de Microorganismes Déficients en Enzymes de la Respiration Aérobie- *Ann. Inst. Pasteur* 94 : 89-96 (1958).
- 59) MOUSTACCHI, E., Mécanisme de la Radiorésistance des Levures en Bourgeonnement. Influence de Certains Facteurs Métaboliques- *Ann. Inst. Pasteur* 104 : 757-773 (1963).
- 60) MOUSTACCHI, E., Cytoplasmic and Nuclear Genetics Events Induced by UV Light in Strains of *Saccharomyces cerevisiae* with Different UV sensitivities- *Mut. Res.* 7 : 171-185 (1969).

- 61) MOUSTACCHI, E. et S. ENTERIC, Differential Liquid Holding Recovery for the Lethal Effect and Cytoplasmic "Petite" Induction by UV Light in *Saccharomyces cerevisiae*- Molec. Gen. Genetics 109 : 69-83 (1970).
- 62) MUKHERJEE, P. et S.B. BHATTACHARJEE, Recovery of Bacteria from Damages Induced by Heat- J. Gen. Microbiol. 60 : 233-238 (1970).
- 63) MULLER, H.J., The Measurement of Gene Mutation Rate in *Drosophila*, its High Variability and its Dependence upon Temperature- Genetics 13 : 279-357 (1928).
- 64) NASIM, A., Analysis of Yeast Mutants Showing Sensitivity Both to Radiation and Elevated Temperature- Genetics 64 supp 45 (1970).
- 65) NIELSEN, J. et U. FRIEDRICH, Seasonal Variation in Nondisjunction of Sex-Chromosomes- Humangenetik 8 : 258-260 (1969).
- 66) OGUR, M. et R. ST JOHN, A Differential and Diagnostic Plating Method for Population Studies of Respiration Deficiency in Yeast- J. Bacteriol. 72 : 500-504 (1956).
- 67) OGUR, M., R. ST JOHN et S. NAGAI, Tetrazolium Overlay Technique for Population Studies of Respiration Deficiency of Yeast- Science 125 : 928-929 (1957).
- 68) OGUR, M., S. OGUR et R. ST JOHN, Temperature Dependence of the Spontaneous Mutation Rate to Respiration Deficiency in *Saccharomyces*- Genetics 45 : 189-194 (1960).
- 69) PARRY, J.M., et E.M. PARRY, The Effects of UV Light Post-Treatments on the Survival Characteristics of 21 UV Sensitive Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*- Mut. Res. 8 : 545-556 (1969).
- 70) PATRICK, M.H., R.H. HAYNES et R.B. URETZ, Dark Recovery Phenomena in Yeast. I. Comparative Effects with Various Inactivating Agents- Rad. Res. 21 : 144-163 (1964).

- 71) PATRICK, M.H., et R.H. HAYNES, Dark Recovery Phenomena in Yeast. II. Conditions that Modify the Recovery Process- Rad. Res. 23 : 564-579 (1964).
- 72) PAULING, C. et P.C. HANAWALT, Non Conservative DNA Replication in Bacteria after Thymine Starvation- Proc. Nat. Acad. Sci. US 54 : 1728-1735 (1965).
- 73) PERLMAN, P.S. et H.R. MAHLER, A Premutational Site Induced in Yeast by Ethidium Bromide (sous presse).
- 74) PETITJOHN D. et P.C. HANAWALT, Evidence for Repair Replication of Ultraviolet Damaged DNA in Bacteria- J. Mol. Biol. 9 : 395-410 (1964).
- 75) PLOUGH, H.H., The Effect of Temperature on Crossing-Over in Drosophila- J. Exp. Zool. 24 : 143-209 (1917).
- 76) PLOUGH, H.H., Spontaneous Mutability in Drosophila- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9 : 127-137 (1941).
- 77) POLLARD, E. et J. SETLOW, Action of Heat on the Serological Affinity of T1 Bacteriophage- Arch. Biochem. Biophys 43 : 136-142 (1953).
- 78) POLLARD, E. et W. SOLOSKO, The Thermal Inactivation of T4 and λ Bacteriophage- Biophys. J. 11 : 66-74 (1971).
- 79) PRINGSHEIM, E.G. et O. PRINGSHEIM, Experimental Elimination of Chromatophores and Eye-spot in Euglena gracilis- New Phytologist 51 : 65-76 (1952).
- 80) RADMAN, M., L. CORDONE, D. KRSMANOVIC-SIMIC et M. ERRERA, Complementary Action of Recombination and Excision in the Repair of U.V. Irradiation Damage to DNA- J. Mol. Biol. 49 : 203-212 (1970).
- 81) RAHN, O., Sterilization of Microorganisms- Bact. Rev. 9 : 1-47 (1945).
- 82) REITER, H. et B. STRAUSS, Repair of damage Induced by a Monofunctional Alkylating Agent in a Transformable Ultraviolet-Sensitive Strain of Bacillus subtilis- J. Mol. Biol. 14 : 179-194 (1965).

- 83) RESNICK, M.A., Genetic Control of Lethality and Mutation in *Saccharomyces cerevisiae*- US at Energy Comm. Doc. UCRL 18404 (1968) Thesis.
- 84) RHOADES, M.M., Genetics of Mutability in Maize- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9 : 138-144 (1941).
- 85) RICHARDS, O.W., The Analysis of Growth as Illustrated by Yeast- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 2 : 157-166 (1934).
- 86) ROGER, M. et R.D. HOTCHKISS, Selective Heat Inactivation of Peumococcal Transforming Deoxyribonucleate-Proc. Nat.Acad. Sci. US 47 :653-669 (1961).
- 87) ROLFE, B. et B.W. HOLLOWAY, Alterations in Host Specificity of Bacterial DNA after an Increase in Growth Temperature of *Pseudomonas aeruginosa*- J. Bacteriol. 92 : 43-48 (1966).
- 88) ROSENTHAL, L.J. et J.J. IANDOLO, Thermally Induced Intracellular Alterations of Ribosomal Ribonucleic Acid- J. Bacteriol. 103 : 833-835 (1970).
- 89) RORSH, A., P. VAN DE PUTTE, I.E. MATTERN, H. ZWENK et C.A. VAN SLUIS, Genetic and Enzymic Control of Radiation Sensitivity in *E. coli*, in Genetic Aspects of Radiosensitivity: Mechanisms of Repair, International Atomic Energy Agency, Vienna (1966).
- 90) SAUERBIER, W., Inhibition of Host-Cell Reactivation in Phage T1 by Caffeine- Biochem. Biophys. Res. Commun. 14 : 340-346 (1964).
- 91) SCHNEIDER, W.C., Phosphorus Compounds in Animal Tissues. I. Extraction and Estimation of Deoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid- J. Biol. Chem. 161 : 293-303 (1945).
- 92) SEDLIAKOVA, M., D. BILLEN et L. BRUNS, A Study of the Relationship between Survival and "Repair Synthesis" of DNA after UV Light Exposure- Photochem. Photobiol. 11 : 109-317 (1970).
- 93) SETLOW, R.B., W.L. CARRIER et J.K. SETLOW, The Action of an Endonuclease Specific for Damaged DNA,- Biophys. Soc. Abstr. 9 : A57 (1969).

- 94) SHANKEL, D.M. et J.A. KLEINBERG, Comparison of Mutational Synergism elicited by Caffeine and Acryflavine with UV Light-Genetics 56 : 589 (1967).
- 95) SHERMAN, F., The Heat Inactivation and Production of Cytochrome Deficiency in Yeast- Exp. Cell Res. 11 : 659-660 (1956).
- 96) SHERMAN, F., A Study of the Effects of Elevated Temperatures on the Growth and Inheritance of *Saccharomyces cerevisiae*- Ph.D. Thesis, USAEC Report, UCRL 8573, University of California, Radiation Laboratory, Berkeley (1958).
- 97) SIDEROPOULOS, A.S., R.C. JOHNSON et D.M. SHANKEL, Mutational Synergism between Heat and Sublethal Dosages of UV Light in *E. coli* Strains- J. Bacteriol. 95 : 1486-1488 (1968).
- 98) SIDEROPOULOS, A.S. et D.M. SHANKEL, Mechanism of Caffeine Enhancement of Mutations Induced by Sublethal Ultraviolet Dosages- J. Bacteriol. 96 : 198-204 (1968).
- 99) SISLER, H.D. et M.R. SIEGEL, Cycloheximide and Other Glutarimide Antibiotics- In Antibiotics I. Mechanism of Action, Ed., Gottlieb D. & P.D. Shaw, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York pp. 283-307 (1967).
- 100) SITZ, T.O., A.B. KENT, H.A. HOPKINS et R. SCHMIDT, Equilibrium Density Gradient Procedure for Selection of Synchronous Cells from Asynchronous Cultures- Science 168 : 1231-1232 (1970).
- 101) SKOBKIN, S.V., The Role of Physiological State in Genetic Radiosensitivity of Haploid Yeasts- Second Conference of Department of Radiobiology of Kurchatov's Institute of Atomic Energy, Moscow, 108-120 (1969).
- 102) SLONIMSKI, P., Formation d'Enzymes Respiratoires chez les Levures- Actualités Biochim., Masson et Cie, Paris (1953).
- 103) SMITH, K.C. et P.C. HANAWALT, Molecular Photobiology-Inactivation and Recovery- Academic Press, New York & London (1969).

- 104) SMITH, L.S. et A.P. KRUCER, Thermal Inactivation of a New Vibrio Phage-
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81 : 371 (1952).
- 105) SNOW, R., Communication Personnelle.
- 106) SOGIN, S.J. et Z.J. ORDAL, Regeneration of Ribosomes and Ribosomal Ribonucleic Acid During Repair of Thermal Injury to Staphylococcus aureus- J. Bacteriol. 94 : 1082-1087 (1967).
- 107) SONNEBORN, T.M., Experimental Control of the Concentration of Cytoplasmic Genetic Factors in Paramecium- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11 : 236-255 (1946).
- 108) STAMBERG, J. et G. SIMCHEN, Specific Effects of Temperature on Recombination in Schizophyllum commune- Heredity 25 : 41-52 (1970).
- 109) STRAUSS B.S. et R. WAHL, The Presence of Breaks in the Deoxyribonucleic Acid of Bacillus subtilis Treated In Vivo with the Alkylating Agent, Methylmethanesulfonate- Biochim. Biophys. Acta 80 : 116-126 (1964).
- 110) STRAUSS B.S., DNA Repair Mechanisms and their Relation to Mutation and Recombination- in Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin-Heidelberg, New York, Springer (1968).
- 111) SUSLOVA, N.G. et I.A. ZAKHAROV, The Gene Controlled Radiation Sensitivity of Yeast, VII Identification of the Genes for the X-Ray Sensitivity- Genetica 6 n°8 (1970).
- 112) TOMLINS, R.I. et Z.J. ORDAL, Requirements of Salmonella typhimurium for Recovery from Thermal Injury- J. Bacteriol. 105 : 512-518 (1971).
- 113) VAN HALTEREN, P., Effects d'un Choc Thermique sur le Métabolisme des Levures- Bull. Soc. Chim. Biol. 32 : 458-463 (1950).
- 114) VON BORSTEL, R.C., K.T. CAIN et C.M. STEINBERG, Inheritance of Spontaneous Mutability in Yeast- (sous presse).

- 115) WESTERGAARD, O., Separation of two DNA Polymerase Fractions from Tetrahymena Cells after Excision-Repairable Damage to DNA- Biochim. Biophys. Acta 213 : 36-44 (1970).
- 116) WHITE, J., Effects of Common Bactericidal Substances and of Heat on Yeast Growth and Viability- J. Inst. Brewing 59 : 470-479 (1953).
- 117) WIAME, J.M., J. BECHET, M. LOUNSET et M. DE DEKEN-CRENSON, Mise en Evidence d'une Perméase de l'Arginine chez Saccharomyces cerevisiae- Arch. Int. Physiol. Biochim. 70 : 766-767 (1962).
- 118) WILLIAMSON, D.H., The Timing of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Cell Cycle of Saccharomyces cerevisiae- J. Cell. Biol. 25 : 517-528 (1965).
- 119) WILLIAMSON, D.H., Division Synchrony in Yeasts- In: Synchrony in Cell Division and Growth, John Wiley and Sons Inc. (1964).
- 120) WILLIAMSON, D.H. et E. MOUSTACCHI, The Synthesis of Mitochondrial DNA During the Cell Cycle in the Yeast Saccharomyces cerevisiae- Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 : 195-201 (1971).
- 121) WITKIN, E.M. et E.L. FARQUHARSON, Enhancement and Diminution of Ultraviolet-Light Initiated Mutagenesis by Post-Treatment with Caffeine in E. coli- Ciba Found. Symp. on Mutation as Cellular Process, J. & A. Churchill Ltd., London, pp. 36-49 (1969).
- 122) WOESE, C., Thermal Inactivation of Animal Viruses- Ann. N.Y. Acad. Sci. 83 : 741-751 (1960).
- 123) WOOD, T.H., Influence of Temperature and Phase State on X-Ray Sensitivity of Yeast- Arch. Biochem. Biophys. 52 : 157-174 (1954).
- 124) WOOD, T.H., Lethal Effects of High and Low Temperatures on Unicellular Organisms- Advances in Biological & Medical Physics 4 : 119-168 (1956).
- 125) YCAS, M., A Hereditary Cytochrome Deficiency Appearing in Yeast Grown at an Elevated Temperature- Exp. Cell Res. 10 : 746 (1956).

- 126) THE YEASTS II PHYSIOLOGY and BIOCHEMISTRY OF YEASTS, Ed. par ROSE A.H. et J.S. HARRISON, Academic Press, London New York (1971).
- 127) YOUNGNER, J., Thermal Inactivation Studies with Different Strains of Poliovirus- J. Immunol. 78 : 282-290 (1957).
- 128) ZAMENHOF, S., Effects of Heating Dry Bacteria and Spores on their Phenotype and Genotype- Proc. Nat. Acad. Sci. US 46 : 101-105 (1960).
- 129) ZAMENHOF, S. et S. GREER, Heat as an Agent Producing High Frequency of Mutations and Unstable Genes in E. coli- Nature 182 : 611-613 (1958).
- 130) ZAMENHOF, S., G. LEIDY, E. HAHN et H.E. ALEXANDRE, Inactivation and Unstabilization of the Transforming Principle by Mutagenic Agents- J. Bacteriol. 72 : 1-11 (1956).
- 131) ZAMENHOF, S., G. LEIDY, S. GREER et E. HAHN, Differential Stabilities of Individual Heredity Determinants in Transforming Principle.- J. Bacteriol. 74 : 194-199 (1957).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
- Effet de la ploïdie sur la thermosensibilité	p. 3
- Effet mutagène de la température	p. 4
- Action de la température sur la recombinaison génétique	p. 4
- Allure exponentielle de la courbe d'inactivation thermique	p. 5
- Effet de la température sur la division	p. 6
- Action des hautes températures sur le facteur transformant	p. 6
- Mise en évidence de ruptures dans l'ADN de bactéries chauffées	p. 7
PLAN DU TRAVAIL	p. 7
MATERIEL ET METHODES	
- Souches	p. 10
- Milieux de culture	p. 11
- Détection des mutants "petite colonie"	p. 12
- Conditions de croissance	p. 13
- Dissociation des amas par les ultra-sons	p. 13
- Sources et conditions d'irradiation	p. 14
- Traitement thermique	p. 14
RESULTATS	
A - Effet létal d'une température supra-optimale sur une souche haploïde sauvage	p. 16
1- Choix de la température d'inactivation	p. 16
2- Description de l'effet létal	p. 17
3- Etude de la fraction thermorésistante	p. 18
4- Influence de la phase de croissance sur la thermosensibilité	p. 19
5- Etude de l'inactivation à 52°C sur des cellules en croissance synchronisée	p. 20

B - Réparation de l'effet létal de la température supra-optimale	p. 23
1- Description de l'effet	p. 23
2- Caractères de la réparation	p. 24
a) Cinétique	p. 24
b) Effet du froid	p. 25
c) Effet du blocage de la synthèse protéique nucléaire	p. 25
C - Effet mutagène de l'incubation à 52°C	p. 29
1- Induction de mutants cytoplasmiques "petite colonie"	p. 29
a) Description de l'effet	p. 29
b) Thermosensibilité au cours du cycle cellulaire	p. 30
c) Réparation des lésions mutagènes	p. 31
c1 - Effet du froid	p. 31
c2 - Effet de la cycloheximide	p. 31
2- Effet mutagène nucléaire de la température de 52°C	p. 32
a) Influence de la phase de croissance	p. 33
b) Réparation des lésions mutagènes	p. 34
D - Comparaison des effets de la température supra-optimale sur différents mutants de radiosensibilité	p. 34
1- Mutants sensibles aux rayons ultraviolets	p. 34
2- Mutants sensibles à la fois aux rayons ultraviolets et aux radiations ionisantes	p. 35
3- Effet de la caféine sur la réparation des thermolésions	p. 36
4- Mutants sensibles aux radiations ionisantes	p. 37
a) Mutants isolés par Snow	p. 37
b) Mutants isolés par Resnick	p. 38
c) Mutants isolés par Suslova et Zakharov	p. 39

DISCUSSION

A - Effet létal de la température de 52°C	p. 40
B - Variations de la sensibilité à l'effet létal du traitement thermique au cours du cycle cellulaire	p. 41

C - Réparation des thermolésions létales	p. 43
1- Cinétique	p. 44
2- Effet du froid	p. 44
3- Effet du blocage de la synthèse protéique nucléaire	p. 44
a) Blocage avant le traitement thermique	p. 44
b) Blocage après le traitement thermique	p. 46
D - Effet mutagène de la température de 52°C	p. 47
1- Mutations cytoplasmiques	p. 47
a) Variations de thermosensibilité au cours du cycle cellulaire	p. 47
b) Réparation des lésions mutagènes	p. 48
2- Mutations nucléaires	p. 50
E - Comparaison entre radio et thermosensibilités	p. 52
PERSPECTIVES	p. 55
RESUME	p. 57
BIBLIOGRAPHIE	p. 59

